

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4782668号  
(P4782668)

(45) 発行日 平成23年9月28日 (2011.9.28)

(24) 登録日 平成23年7月15日 (2011.7.15)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 Q 1/70 (2006.01)

C 1 2 Q 1/70

請求項の数 14 (全 66 頁)

(21) 出願番号 特願2006-504919 (P2006-504919)  
 (86) (22) 出願日 平成16年3月30日 (2004.3.30)  
 (65) 公表番号 特表2006-521799 (P2006-521799A)  
 (43) 公表日 平成18年9月28日 (2006.9.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2004/003356  
 (87) 国際公開番号 W02004/092412  
 (87) 国際公開日 平成16年10月28日 (2004.10.28)  
 審査請求日 平成18年12月26日 (2006.12.26)  
 (31) 優先権主張番号 60/459,491  
 (32) 優先日 平成15年3月31日 (2003.3.31)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/552,454  
 (32) 優先日 平成16年3月12日 (2004.3.12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 591003013  
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  
 F. HOFFMANN-LA ROCH  
 E AKTIENGESELLSCHAFT  
 スイス・シーエイチー４０７０バーゼル・  
 グレンツアーヘルストラッセ１２４  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーを包含する一定のフラビウイルスを検出するための組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーを検出するためのキットであって、

(a) 配列番号：8の配列を含んでなる第1オリゴヌクレオチド；

(b) 配列番号：9の核酸に特異的にハイブリダイズする第2オリゴヌクレオチド；及び

(c) 配列番号：16の核酸又はその相補体に特異的にハイブリダイズする、検出可能にラベルされた第3オリゴヌクレオチド、  
を含んで成るキット。

【請求項 2】

配列番号8の位置24における残基が、N<sup>6</sup>-アルキル-デオキシアデノシンである、請求項1に記載のキット。

【請求項 3】

前記検出可能にラベルされた第3オリゴヌクレオチドが、配列番号：28の少なくとも20個の連続するヌクレオチド又はその相補体を含んでなる、請求項1又は2に記載のキット。

【請求項 4】

前記検出可能にラベルされた第3オリゴヌクレオチドが、蛍光成分を含んでなる、請求項1～3のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 5】

10

20

前記検出可能にラベルされた第3オリゴヌクレオチドが、消光剤を更に含んでなる、請求項4に記載のキット。

【請求項6】

熱安定性DNAポリメラーゼを更に含んでなる、請求項1～5のいずれか1項に記載のキット。

【請求項7】

前記熱安定性DNAポリメラーゼが、カルボキシドサーマス・ヒドロゲンホルマンスDNAポリメラーゼ、サーモシフォ・アフリカナスDNAポリメラーゼ、パチルス・パアリダスDNAポリメラーゼ、サーマス種Z05 DNAポリメラーゼ、サーマス・アクアチカスDNAポリメラーゼ、サーマス・サーモフィラスDNAポリメラーゼ、サーマトガ・マリチマDNAポリメラーゼ、サーマトガ・ネアパリタナDNAポリメラーゼ及びサーマス種17 DNAポリメラーゼから成る群から選択される、請求項6に記載のキット。

10

【請求項8】

日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーを検出するための説明書を更に含んでなる、請求項1～7のいずれか1項に記載のキット。

【請求項9】

前記第2オリゴヌクレオチドが、配列番号：15の配列を含んでなる、請求項1～8のいずれか1項に記載のキット。

【請求項10】

配列番号：15の位置23における残基が、N<sup>6</sup>-アルキル-デオキシアデノシンである、請求項9に記載のキット。

20

【請求項11】

前記第2オリゴヌクレオチドが、配列番号：74の配列を含んでなる、請求項9に記載のキット。

【請求項12】

日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を検出するための方法であって、

(1) サンプルを、配列番号：8の配列を含んでなる第1オリゴヌクレオチド、及び配列番号：9の核酸に特異的にハイブリダイズする第2オリゴヌクレオチドと接触せしめ、ここで、当該第1オリゴヌクレオチド又は第2オリゴヌクレオチドは、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸が前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることを可能にする条件下に固体支持体に共有結合されており；

30

(2) 日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を増幅し；

(3) 配列番号：16の核酸又はその相補体に特異的にハイブリダイズする、検出可能にラベルされた第3オリゴヌクレオチドと前記固体支持体とを接触せしめ；そして

(4) 日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸への、前記検出可能にラベルされた第3オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することにより、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を検出する；

ことを含んでなる方法。

【請求項13】

日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を検出するための方法であって、

40

(1) サンプルを、配列番号：8の配列を含んでなるオリゴヌクレオチド又は配列番号：9の核酸に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと接触せしめ、ここで、当該オリゴヌクレオチドは、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸が前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることを可能にする条件下に固体支持体に共有結合されており；

(2) 配列番号：16の核酸又はその相補体に特異的にハイブリダイズする、検出可能にラベルされた第3オリゴヌクレオチドと前記固体支持体とを接触せしめ；そして

(3) 日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸への、前記検出可能にラベルされた第3オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することにより、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を検出する；

50

ことを含んでなる方法。

【請求項 14】

日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を検出するための方法であって、

(1) サンプルと、配列番号：16の核酸又はその相補体に特異的にハイブリダイズする、検出可能にラベルされた核酸プローブ、配列番号：8の配列を含んでなる第1オリゴヌクレオチド及び配列番号：9の核酸に特異的にハイブリダイズする第2オリゴヌクレオチド、並びに5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存性核酸ポリメラーゼとを、当該鋳型依存性核酸ポリメラーゼが前記検出可能にラベルされた核酸プローブを断片化することを可能にする条件下で接触せしめ；そして

(2) 前記検出可能にラベルされた核酸プローブの断片化を検出し、ここで当該検出可能にラベルされた核酸プローブの断片化が日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸の存在を示す；

ことを含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の背景：

フラビビリダエ (Flaviviridae) 科及びフラビウイルス (Flavivirus) 属は、実質的に致死性のヒト病原体である多くのウイルスを包含する。そのようなウイルスは、デング熱ウイルス、黄熱病ウイルス、モドックウイルス (Modoc virus)、及び日本脳炎ウイルス血清グループ (serogroup) のウイルスを包含する。日本脳炎ウイルス血清グループは、いくつかの密接に関連するウイルス、例えば日本脳炎ウイルス (JEV)、西ナイル熱ウイルス (WNV)、セントルイス脳炎ウイルス、マリーバレー (Murray Valley) 脳炎ウイルス及びクンジンウイルス (Kunjin virus) を包含する。クンジンウイルスはしばしば、それらの2種のウイルス間の配列保存の程度のために、WNVの変異体として言及される。特徴づけられたWNV株は、配列分解に基づいて、2種のグループ、すなわち系統I及びIIに分割されて来た。

【0002】

1999年、アメリカ合衆国におけるヒトWNV感染の最初の事例が報告されている。それ以来、毎年の流行が発生して来た。2002年8月、蚊による刺傷以外の経路を通してのWNVの伝達が、4種の器官受容体が単一の器官ドナーにより感染された場合に確認されている。そのウイルスは、血液製品 (21の確認された事例) の輸血及び乳汁により伝達できることが見出されている。

【0003】

活性WNV感染の検出は、徴候が非特異的であり、そしてウイルス - 特異的抗体が通常ウイルス血相の後でのみ検出され得るので、困難である。さらに、WNV - 特異的IgMは1年以上の間、存続し、活性感染と過去の暴露との間で区別を困難にする。より敏感な検出方法、例えばウイルス核酸の直接的な検出が必要とされる。ウイルス核酸の検出は、現在使用される血清学的方法よりも、WNV及び他のフラビウイルスによる感染の初期検出のためのより敏感な方法を提供する。

【0004】

他のフラビウイルス、例えば日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーはまた、ヒト病原体である。それらの病原体は、日本脳炎血清グループメンバー、例えば日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス (SLEV)、及びマリーバレー脳炎ウイルス、及び他のフラビウイルス、例えばデング熱ウイルス、黄熱病ウイルス、及びモドックウイルスを包含する。血液製品を通してWNV以外の日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの伝達は未報告のままである。しかしながら、そのような伝達は、それらのウイルスがより広がって来ているので、発生するには可能であり、且つますますありうる。従って、ヒト病原体であるそれらのフラビウイルスを検出できる、新規で敏感な且つ特異的アッセイが高く所望される。さらに、日本脳炎血清グループのいくつかのメンバーを検出できる単一のアッセイ

10

20

30

40

50

がまた、非常に所望される。

【発明の開示】

【0005】

発明の簡単な要約：

本発明は、日本脳炎ウイルス血清グループのいくつかのメンバーを包含する一定のフラビウイルスの核酸の存在を検出するための組成物、方法及びキットを提供する。本発明の組成物及び方法は、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの存在を検出するためにプライマー及びプローブとして使用され得るオリゴヌクレオチドの発現に一部、基づかれています。例えば、西ナイルウイルス、クンジンウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス（SLEV）及びマリーバレー脳炎ウイルスは、本発明のオリゴヌクレオチドにより検出され得る。さらに、本発明のオリゴヌクレオチドは、日本脳炎ウイルス血清グループ以外のフラビウイルス、例えばデング熱ウイルス、モンタナ筋炎白質脳炎ウイルス、モドックウイルス及び黄熱病ウイルスを検出するために使用され得る。本発明のオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される方法に従ってそれらの検出するためにプライマー及びプローブとして使用され得る。

10

【0006】

ある観点においては、本発明は、日本脳炎ウイルス血清グループのいくつかのメンバーの核酸を検出するための方法を提供する。その方法においては、下記に詳細に記載される本発明の検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、日本脳炎ウイルス血清グループのいくつかのメンバーの核酸を検出するためのプローブとして使用される。前記プローブは、本発明に従って検出され得るフラビウイルス核酸の3'末翻訳領域における保存された領域の配列である、配列番号16又はその相補体の核酸にハイブリダイズする。本発明のある態様においては、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する鋳型-依存性核酸ポリメラーゼはプローブを断片化し、ここで検出できるようラベルされたプローブの断片化が日本脳炎血清グループのメンバーの核酸の存在を示す。

20

【0007】

ある態様においては、前記方法は、検出できるようラベルされた核酸プローブの存在下で日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を増幅することを含んで成り、ここで前記検出できるようラベルされた核酸プローブは配列番号17又はその相補体の少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含んで成る。他の態様においては、前記方法は、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドの存在下で日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を増幅することを含んで成り、ここで前記検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは配列番号18又はその相補体を含んで成る。

30

【0008】

配列番号18は、本発明に従って検出され得る現在知られているフラビウイルス核酸の保存された領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド配列である。さらに他の態様においては、前記方法は、検出できるようラベルされた核酸プローブの存在下で日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を増幅することを含んで成り、ここで前記検出できるようラベルされた核酸プローブは配列番号28又はその相補体を含んで成る。配列番号28は、本発明に従ってフラビウイルスを検出するために使用され得る特異的プローブ核酸配列である。

40

【0009】

ある態様においては、プローブは検出できる成分である。検出できる成分は、制限なしに当業者に知られているいずれかの検出できる成分であり得る。例えば、検出できる成分は、蛍光成分である。ある態様においては、蛍光成分は、フルオレセイン-ファミリー色素、ポリハロフルオレセイン-ファミリー色素、ヘキサクロロフルオレセイン-ファミリー色素、ローダミン-ファミリー色素、シアニン-ファミリー色素、オキサジン-ファミリー色素、チアジン-ファミリー色素、スクアライン-ファミリー色素、キレート化されたランタニド-ファミリー色素及びBODIPY（商標）-ファミリー色素から成る群から選択され得る。好ましい態様においては、蛍光成分は、6-カルボキシフルオレセインである

50

。

## 【0010】

ある態様においては、プローブは消光剤成分を含んで成る。消光剤成分は、制限なしに当業者に知られているいずれかの消光剤成分であり得る。ある態様においては、消光剤成分は、フルオレセイン - ファミリー色素、ポリハロフルオレセイン - ファミリー色素、ヘキサクロロフルオレセイン - ファミリー色素、ローダミン - ファミリー色素、シアニン - ファミリー色素、オキサジン - ファミリー色素、チアジン - ファミリー色素、スクアライン - ファミリー色素、キレート化されたランタニド - ファミリー色素、BODIPY (商標) - ファミリー色素、及び非蛍光消光剤成分から成る群から選択され得る。ある態様においては、前記非蛍光消光剤成分は、BHO<sup>TM</sup> - ファミリー色素、Iowa Block<sup>TM</sup>又はDabcylであり得る。好ましい態様においては、消光剤成分は、Cy5<sup>TM</sup>である。

10

## 【0011】

ある観点においては、日本脳炎ウィルス血清グループメンバーの核酸は、本発明のオリゴヌクレオチドにより検出され得る。ある態様においては、配列番号1の核酸にハイブリダイズする第1のオリゴヌクレオチドは、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を増幅するためのプライマーとして使用され得る。配列番号1は、本発明に従って検出され得る日本脳炎ウィルス血清グループのメンバー間に保存される配列の発見に基づかれている。ある態様においては、第1のプライマーは、配列番号2の少なくとも16個の連続ヌクレオチドを含んで成る。

## 【0012】

20

他の態様においては、第1のプライマーは配列番号3を含んで成る。配列番号3は、本発明に従って検出され得る日本脳炎ウィルス血清グループメンバーからのすべての現在知られている配列の保存された領域の発見に基づかれている。さらなる他の態様においては、第1のプライマーは、配列番号8を含んで成る。配列番号8は、本発明に従って日本脳炎血清グループメンバーの核酸を増幅するために使用され得る特異的プライマー配列である。

## 【0013】

ある態様においては、配列番号9の核酸にハイブリダイズする第2のオリゴヌクレオチドは、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を増幅するためのプライマーとして使用され得る。配列番号9は、本発明に従って検出され得る日本脳炎ウィルス血清グループのメンバー間に保存される配列の発見に基づかれるコンセンサス配列である。ある態様においては、第2のプライマーは、配列番号10の少なくとも16個の連続ヌクレオチドを含んで成る。配列番号10は、配列番号9の相補体である。他の態様においては、第2のプライマーは配列番号11を含んで成る。

30

## 【0014】

配列番号11は、本発明に従って検出され得る日本脳炎ウィルス血清グループメンバーからのすべての現在知られている配列の保存された領域の発見に基づかれている。さらなる他の態様においては、第2のプライマーは、配列番号15又は74を含んで成る。配列番号15及び74は、本発明に従って日本脳炎血清グループメンバーの核酸を増幅するために使用され得る特異的プライマー配列である。ある態様においては、第1及び第2のプライマーは、日本脳炎血清グループのメンバーの核酸を検出するための方法において、一緒に使用され得る。

40

## 【0015】

ある態様においては、前記方法は、蛍光成分及び消光剤成分を含んで成る、検出でできるようレベルされた核酸プローブの存在下で日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を増幅することを含んで成る。ある態様においては、5' 3' ヌクレアーゼ活性を有する鋳型 - 依存性核酸ポリメラーゼによる、検出できるようラベルされたプローブの断片化は、消光剤成分から蛍光成分を分類する。ある態様においては、プローブの断片化及び従って、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸の存在が、蛍光の発光をモニターすることにより検出され得る。

50

## 【 0 0 1 6 】

ある態様においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、固体支持体に共有結合される本発明のプライマー又はプローブ前記核酸をハイブリダイズすることにより検出され得る。ある態様においては、前記核酸は、前記核酸に検出できるようラベルされたプライマー又はプローブをハイブリダイズすることにより検出され得る。他の態様においては、核酸は、その核酸中に検出できる成分を組込むことにより、直接的に検出され得る。

## 【 0 0 1 7 】

他の態様においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、それに共有結合される本発明の複数のプライマー又はプローブに共に超微粒子を用いて検出され得る。さらに他の態様においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、本発明のプライマー及び/又はプローブと共に回転円増幅アッセイを用いて検出され得る。さらなる他の態様においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、本発明の2種のプライマーと共に鎖置換増幅アッセイを用いて検出され得る。

10

## 【 0 0 1 8 】

さらに他の態様においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、本発明のプライマー及び/又はプライマーを用いる転写 - 介在性増幅アッセイを用いて検出され得る。さらにもう1つの態様においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、本発明のプライマー及び/又はプローブを用いる、核酸配列に基づく増幅 (NASBA) アッセイを用いて検出され得る。さらにもう1つの態様においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、本発明のプライマー及び/又はプローブと共に診断用PCRを用いて検出され得る。

20

## 【 0 0 1 9 】

ある態様においては、本発明の第1及び第2プライマー及びプローブは、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーを検出するための方法において一緒に使用され得る。ある態様においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、分子ビーコンを含んで成る本発明のプローブを用いて検出され得る。他の態様においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、本発明のプライマー及び/又はプローブと共に、核酸配列決定に基づく増幅アッセイを用いて検出され得る。

## 【 0 0 2 0 】

30

さらなる他の態様においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、本発明の2種のプライマーにより前記核酸を増幅し、次に、本発明の検出できるようラベルされたプローブにより前記核酸を検出することにより、検出され得る。ある態様においては、#日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、本発明のプライマー及び/又はプローブと共にドットプロットアッセイを用いて検出され得る。他の態様においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、本発明のプライマー及び/又はプローブと共に逆ドットプロットアッセイを用いて検出され得る。さらなる他の態様においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、多価プローブ、例えばデンドリマーを用いて検出され得る。

## 【 0 0 2 1 】

40

前述の方法の他に、本発明はさらに、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を検出するための核酸プライマー及びプローブを提供する。ある観点においては、本発明は、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を検出するための核酸プライマーを提供する。ある態様においては、プライマーは、配列番号1の核酸にハイブリダイズする核酸を含んで成る。ある態様においては、核酸プライマーは、配列番号2の少なくとも16個の連続したヌクレオチドを含んで成る。他の態様においては、核酸プライマーは配列番号3を含んで成る。さらに他の態様においては、核酸プライマーは、配列番号8を含んで成る。

## 【 0 0 2 2 】

ある態様においては、核酸プライマーは、配列番号8の位置23でN<sup>6</sup> - アルキル - デオキ

50

シアデノシンを含んで成る。特定の態様においては、核酸プライマーは、位置 8 の位置 23 で N<sup>6</sup> - メチル デオキシアデノシンを含んで成る。ある態様においては、核酸プライマーは、配列番号 8 の位置 24 で N<sup>6</sup> - tert - ブチル - ベンジル - デオキシアデノシンを含んで成る。ある態様においては、核酸プライマーは、配列番号 8 の位置 23 及び 24 で N<sup>6</sup> - アルキル - デオキシアデノシンを含んで成る。さらにもう 1 つの特定の態様においては、核酸プライマーは、配列番号 8 の位置 23 で N<sup>6</sup> - メチル デオキシアデノシン、及び配列番号 8 の位置 24 で N<sup>6</sup> - tert - ブチル - ベンジル - デオキシアデノシンを含んで成る。

【 0 0 2 3 】

ある態様においては、本発明は、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーを検出するための核酸プライマーを提供する。他の態様においては、核酸プライマーは、配列番号 10 の少なくとも 16 個の連続したヌクレオチドを含んで成る。さらなる他の態様においては、核酸プライマーは、配列番号 11 を含んで成る。さらに他の態様においては、核酸プライマーは、配列番号 15 又は 74 を含んで成る。ある態様においては、核酸プライマーは、配列番号 15 又は 74 の位置 24 で N<sup>6</sup> - アルキル - デオキシアデノシンを含んで成る。特定の態様においては、核酸プライマーは、配列番号 15 又は 74 の位置 24 で N<sup>6</sup> - tert - ブチル - ベンジル - デオキシアデノシンを含んで成る。

【 0 0 2 4 】

他の観点においては、本発明はフラビウスの核酸を検出するための核酸プローブを提供する。前記プローブにより検出され得るフラビウス核酸は、例えば日本脳炎ウイルス血清グループのメンバー又はデング熱ウイルス、黄熱病ウイルス、モンタナ筋炎白質脳炎ウイルス、又はモドックウイルスを包含する。ある態様においては、前記プローブは、配列番号 16 又はその相補体の核酸にハイブリダイズする核酸を含んで成る。ある態様においては、核酸プローブは、配列番号 17 又はその相補体の少なくとも 20 個の連続したヌクレオチドを含んで成る。他の態様においては、核酸プローブは、配列番号 18 又はその相補体を含んで成る。さらなる他の態様においては、核酸プローブは、配列番号 28 又はその相補体を含んで成る。

【 0 0 2 5 】

ある態様においては、本発明は、蛍光成分及び消光剤成分を含んで成る核酸プローブを提供する。ある態様においては、蛍光成分は、蛍光成分により放される光子が、プローブが損なわれない場合、消光剤成分により吸収されるよう、消光剤成分に対して位置決定される。5' ヌクレアーゼ活性を有する酵素によるプローブの断片化は、蛍光成分により放される光子が検出され得るよう、消光剤成分から蛍光成分を分離する。

【 0 0 2 6 】

他の観点においては、本発明は日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸の検出のためのキットを提供する。ある態様においては、キットは、本発明のオリゴヌクレオチドを含んで成る。さらなる態様においては、キットは、本発明の 1 又は複数のプライマー及びプローブの組合せを含んで成る。例えば、1 つの態様においては、キットは、配列番号 1 の核酸にハイブリダイズする第 1 の核酸プライマー；配列番号 9 の核酸にハイブリダイズする第 2 の核酸プライマー；及び配列番号 16 又はその相補体の核酸にハイブリダイズする核酸プローブを含んで成る。

【 0 0 2 7 】

ある態様においては、本発明のキットの第 1 の核酸プライマーは、配列番号 2 の少なくとも 16 個の連続したヌクレオチドを含んで成る。他の態様においては、前記第 1 の核酸プライマーは配列番号 3 を含んで成る。さらに他の態様においては、第 1 の核酸プライマーは配列番号 8 を含んで成る。ある態様においては、第 1 の核酸プライマーは、配列番号 8 の位置 23 で N<sup>6</sup> - アルキル - デオキシアデノシンを含んで成る。特定の態様においては、第 1 の核酸プライマーは、位置 8 の位置 23 で N<sup>6</sup> - メチル デオキシアデノシンを含んで成る。第 1 の核酸プライマーは、位置 8 の位置 24 で N<sup>6</sup> - アルキル デオキシアデノシンを含んで成る。

【 0 0 2 8 】

特定の態様においては、第1の核酸プライマーは、配列番号8の位置24でN<sup>6</sup>-tert-ブチル-ベンジル-デオキシアデノシンを含んで成る。ある態様においては、第1の核酸プライマーは、配列番号8の位置23及び24でN<sup>6</sup>-アルキル-デオキシアデノシンを含んで成る。さらにもう1つの特定の態様においては、第1の核酸プライマーは、配列番号8の位置23でN<sup>6</sup>-メチル-デオキシアデノシン、及び配列番号8の位置24でN<sup>6</sup>-tert-ブチル-ベンジル-デオキシアデノシンを含んで成る。

【0029】

ある態様においては、本発明のキットの第2の核酸プライマーは、配列番号10の少なくとも16個の連続したヌクレオチドを含んで成る。他の態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号11を含んで成る。さらに他の態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号15を含んで成る。ある態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号15の位置24でN<sup>6</sup>-アルキル-デオキシアデノシンを含んで成る。特定の態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号15の位置24でN<sup>6</sup>-tert-ブチル-ベンジル-デオキシアデノシンを含んで成る。

【0030】

ある態様においては、本発明のキットの核酸プローブは、配列番号17又はその相補体の少なくとも20個の連続したヌクレオチドを含んで成る。他の態様においては、核酸プローブは、配列番号18又はその相補体を含んで成る。さらに他の態様においては、核酸プローブは、配列番号28又はその相補体を含んで成る。

【0031】

ある態様においては、本発明のキットは、核酸プローブとして有用なオリゴヌクレオチドを含んで成り、ここで1又は複数の検出できる成分が核酸プローブに結合される。ある態様においては、前記1又は複数の検出できる成分は蛍光成分を含んで成る。ある態様においては、蛍光成分は、フルオレセイン-ファミリー色素、ポリハロフルオレセイン-ファミリー色素、ヘキサクロロフルオレセイン-ファミリー色素、ローダミン-ファミリー色素、シアニン-ファミリー色素、オキサジン-ファミリー色素、チアジン-ファミリー色素、スクアライン-ファミリー色素、キレート化されたランタニド-ファミリー色素及びBODIPY(商標)-ファミリー色素から成る群から選択され得る。好ましい態様においては、蛍光成分は、6-カルボキシフルオレセインである。

【0032】

ある態様においては、本発明のキットは、核酸プローブとして有用なオリゴヌクレオチドを含んでなり、ここで少なくとも1つの消光剤成分は前記核酸プローブに結合されている。ある態様においては、消光剤成分は、フルオレセイン-ファミリー色素、ポリハロフルオレセイン-ファミリー色素、ヘキサクロロフルオレセイン-ファミリー色素、ローダミン-ファミリー色素、シアニン-ファミリー色素、オキサジン-ファミリー色素、チアジン-ファミリー色素、スクアライン-ファミリー色素、キレート化されたランタニド-ファミリー色素、BODIPY(商標)-ファミリー色素、及び非蛍光消光剤成分から成る群から選択され得る。ある態様においては、前記非蛍光消光剤成分は、BH0<sup>TM</sup>-ファミリー色素、Iowa Block<sup>TM</sup>又はDabcylであり得る。好ましい態様においては、消光剤成分は、Cy5<sup>M</sup>である。他の態様においては、前記プローブは少なくとももう1つの検出できる成分、例えば蛍光成分及び少なくとも1つの消光剤成分を含んで成る。

【0033】

ある態様においては、本発明のキットは、熱安定性DNAポリメラーゼを含んで成る。ある態様においては、熱安定性DNAポリメラーゼは、逆転写活性を有する。ある態様においては、本発明のキットはさらに、本発明の方法に従って、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を検出するための説明書を包含する。

本発明はまた、配列番号29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39又は40を含んで成るポリヌクレオチドを含んで成るベクターを提供する。

本発明はまた、配列番号29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39又は40を含んで成るポリヌクレオチドを含んで成るベクターを提供する。



## 【 0 0 3 4 】

本発明はまた、配列番号29又はその相補体、配列番号30又はその相補体、配列番号31又はその相補体、配列番号32又はその相補体、配列番号33又はその相補体、配列番号34又はその相補体、配列番号35又はその相補体、配列番号36又はその相補体、配列番号37又はその相補体、配列番号38又はその相補体、配列番号39又はその相補体、又は配列番号40又はその相補体にハイブリダイズする少なくとも10個の連続したヌクレオチドの配列を含んで成るオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの態様においては、前記オリゴヌクレオチドは、配列番号68、又は配列番号69の相補体にハイブリダイズする。いくつかの態様においては、前記オリゴヌクレオチドは、配列番号64、65、66及び67から成る群から選択される配列を含んで成る。いくつかの態様においては、前記オリゴヌクレオチドは、配列番号64、65、66及び67から成る群から選択される。いくつかの態様においては、オリゴヌクレオチドは100個よりも少ないヌクレオチドを有する。

10

## 【 0 0 3 5 】

本発明はまた、配列番号29又はその相補体、配列番号30又はその相補体、配列番号31又はその相補体、配列番号32又はその相補体、配列番号33又はその相補体、配列番号34又はその相補体、配列番号35又はその相補体、配列番号36又はその相補体、配列番号37又はその相補体、配列番号38又はその相補体、配列番号39又はその相補体、又は配列番号40又はその相補体に対してハイブリダイズするヌクレオチド配列を含んで成るオリゴヌクレオチドを含んで成る反応混合物を提供する。

20

## 【 0 0 3 6 】

いくつかの態様においては、前記オリゴヌクレオチドは、配列番号68、又は配列番号69の相補体にハイブリダイズする。いくつかの態様においては、前記オリゴヌクレオチドは、配列番号64、65、66及び67から成る群から選択される配列を含んで成る。いくつかの態様においては、前記オリゴヌクレオチドは、配列番号64、65、66及び67から成る群から選択される。

## 【 0 0 3 7 】

いくつかの態様においては、反応混合物は、配列番号64及び65から成る群から選択されるオリゴヌクレオチド；及び配列番号66及び67から成る群から選択されるオリゴヌクレオチドを含んで成る。いくつかの態様においては、オリゴヌクレオチドは100個よりも少ないヌクレオチドを有する。いくつかの態様においては、反応混合物はさらに、配列番号16又はその相補体にハイブリダイズする、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドを含んで成る。

30

## 【 0 0 3 8 】

いくつかの態様においては、反応混合物は、DNAポリメラーゼを含んで成る。

いくつかの態様においては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、配列番号17又はその相補体の少なくとも20個の連続したヌクレオチドを含んで成る。いくつかの態様においては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、配列番号28又はその相補体を含んで成る。いくつかの態様においては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、蛍光成分を含んで成る。いくつかの態様においては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドはさらに、消光剤成分を含んで成る。

40

## 【 0 0 3 9 】

本発明はまた、セントルイス脳炎ウィルスを検出するための方法を提供する。いくつかの態様においては、前記方法は、配列番号29又はその相補体、配列番号30又はその相補体、配列番号31又はその相補体、配列番号32又はその相補体、配列番号33又はその相補体、配列番号34又はその相補体、配列番号35又はその相補体、配列番号36又はその相補体、配列番号37又はその相補体、配列番号38又はその相補体、配列番号39又はその相補体、又は配列番号40又はその相補体に対してハイブリダイズするヌクレオチド配列を含んで成る少なくとも1つのオリゴヌクレオチドにより、セントルイス脳炎ウィルスの核酸を、前記オリゴヌクレオチドからのヌクレオチド配列の少なくとも一部の増幅の開始を可能にする条件下で、増幅し；そしてその増幅された核酸を検出し、それにより、セントルイス脳炎ウ

50

ィルスを検出することを含んで成る。

【 0 0 4 0 】

いくつかの態様においては、オリゴヌクレオチドは、配列番号64、65、66及び67から成る群から選択された配列を含んで成る。いくつかの態様においては、オリゴヌクレオチドは、配列番号64、65、66及び67から成る群から選択される。いくつかの態様のいでは、オリゴヌクレオチドは、配列番号68、又は配列番号69の相補体にハイブリダイズする。いくつかの態様においては、オリゴヌクレオチドは、100個よりも少ないヌクレオチドを有する。

【 0 0 4 1 】

いくつかの態様においては、セントルイス脳炎ウィルスの核酸は、配列番号64及び65から成る群から選択されたプライマー；及び配列番号66及び67から成る群から選択されたプライマーにより増幅される。

10

いくつかの態様においては、検出段階は、配列番号16にハイブリダイズする、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドを、セントルイス脳炎ウィルスの核酸の増幅された核酸にハイブリダイズし；そしてその増幅された核酸へのプローブのハイブリダイゼーションを検出することを含んで成る。

【 0 0 4 2 】

いくつかの態様においては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、配列番号17又はその相補体の少なくとも20個の連続したヌクレオチドを含んで成る。いくつかの態様においては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、配列番号28又はその相補体を含んで成る。いくつかの態様においては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、蛍光成分を含んで成る。いくつかの態様においては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドはさらに、消光剤成分を含んで成る。

20

【 0 0 4 3 】

いくつかの態様においては、増幅された核酸の量は、増幅段階の間に決定され、それにより、サンプル中のウィルスを定量化する。

いくつかの態様においては、増幅段階は、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性を有する鋳型 - 依存性核酸ポリメラーゼを含んで成る増幅反応混合物において、前記鋳型 - 依存性核酸ポリメラーゼによる前記検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドの断片化を可能にする条件下で行われ；そして前記方法はさらに、検出できるようラベルされた核酸オリゴヌクレオチドの断片化を検出することを含んで成る。

30

【 0 0 4 4 】

本発明はまた、セントルイス脳炎ウィルスを検出するためのキットを提供する。いくつかの態様においては、キットは、配列番号29又はその相補体、配列番号30又はその相補体、配列番号31又はその相補体、配列番号32又はその相補体、配列番号33又はその相補体、配列番号34又はその相補体、配列番号35又はその相補体、配列番号36又はその相補体、配列番号37又はその相補体、配列番号38又はその相補体、配列番号39又はその相補体、又は配列番号40又はその相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含んで成るオリゴヌクレオチドを含んで成る。

【 0 0 4 5 】

40

いくつかの態様においては、前記オリゴヌクレオチドは、配列番号68、又は配列番号69の相補体にハイブリダイズする。いくつかの態様においては、前記オリゴヌクレオチドは、配列番号64、65、66及び67から成る群から選択される配列を含んで成る。いくつかの態様においては、前記オリゴヌクレオチドは、配列番号64、65、66及び67から成る群から選択される。

【 0 0 4 6 】

いくつかの態様においては、キットは、配列番号64及び65から成る群から選択されるオリゴヌクレオチド；及び配列番号66及び67から成る群から選択されるオリゴヌクレオチドを含んで成る。いくつかの態様においては、オリゴヌクレオチドは100個よりも少ないヌクレオチドを有する。いくつかの態様においては、キットはさらに、配列番号16又はその

50

相補体にハイブリダイズする、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドを含んで成る。

【 0 0 4 7 】

本発明はまた、配列番号56、57、58、59、60、61、62及び63から成る群から選択された配列を含んで成るオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの態様においては、オリゴヌクレオチドは、配列番号56、57、58、59、60、61、62及び63から成る群から選択される。

本発明はまた、配列番号56、57、58、59、60、61、62及び63から成る群から選択された配列を含んで成るオリゴヌクレオチドを含んで成る反応混合物を提供する。いくつかの態様においては、オリゴヌクレオチドは、配列番号56、57、58、59、60、61、62及び63から成る群から選択される。

10

【 0 0 4 8 】

いくつかの態様においては、反応混合物はさらに、配列番号25又はその相補体にハイブリダイズする、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドを含んで成る。いくつかの態様においては、反応混合物はさらに、FGGTCTAGAIGGTTAGAGGAGACCCTCCAGを含んで成る、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドを含んで成り、ここでFはCY5であり；IはFAMであり；PはPO4であり；UはプロピニルdUであり；そしてEは5 - メチル - dCである。いくつかの態様においては、反応混合物はさらに、配列番号16又はその相補体にハイブリダイズする、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドを含んで成る。

【 0 0 4 9 】

いくつかの態様においては、反応混合物は、DNAポリメラーゼを含んで成る。いくつかの態様においては、反応混合物は、少なくとも1つの上流プライマー及び少なくとも1つの下流プライマーを含んで成る。

20

【 0 0 5 0 】

本発明はまた、黄熱病ウィルスを検出するための方法を提供する。いくつかの態様においては、前記方法は、配列番号56、57、58、59、60、61、62及び63から成る群から選択された配列を含んで成る少なくとも1つのオリゴヌクレオチドにより、黄熱病ウィルスの核酸を、前記オリゴヌクレオチドからのヌクレオチド配列の少なくとも一部の増幅の開始を可能にする条件下で、増幅し；そしてその増幅された核酸を検出し、それにより、黄熱病ウィルスを検出することを含んで成る。

【 0 0 5 1 】

いくつかの態様においては、オリゴヌクレオチドは、配列番号56、57、58、59、60、61、62及び63から成る群から選択される。いくつかの態様においては、検出段階は、配列番号25又はその相補体にハイブリダイズする、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドを、黄熱病ウィルスの核酸の増幅された核酸ハイブリダイズし；そして増幅された核酸への前記検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することを含んで成る。

30

【 0 0 5 2 】

いくつかの態様においては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、FGGTCTAGAIGGTTAGAGGAGACCCTCCAGを含んで成り、ここでFはCY5であり；IはFAMであり；PはPO<sub>4</sub>であり；UはプロピニルdUであり；そしてEは5 - メチル - dCである。いくつかの態様においては、検出段階においては、検出段階は、配列番号16又はその相補体にハイブリダイズする、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドを、黄熱病ウィルスの核酸の増幅された核酸にハイブリダイズし；そして前記増幅された核酸への前記検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することを含んで成る。

40

【 0 0 5 3 】

いくつかの態様においては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、配列番号17又はその相補体の少なくとも20個の連続したヌクレオチドを含んで成る。いくつかの態様においては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、配列番号28又はその相補体を含んで成る。いくつかの態様においては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、蛍光成分を含んで成る。いくつかの態様においては、検出できるよう

50

ラベルされたオリゴヌクレオチドはさらに、消光剤成分を含んで成る。

いくつかの態様においては、オリゴヌクレオチドは、100個よりも少ないヌクレオチドを有する。いくつかの態様においては、増幅された核酸の量は、増幅段階の間に決定され、それにより、サンプル中のウィルスを定量化する。

【0054】

いくつかの態様においては、増幅段階は、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性を有する鋳型 - 依存性核酸ポリメラーゼを含んで成る増幅反応混合物において、前記鋳型 - 依存性核酸ポリメラーゼによる前記検出できるようにラベルされたオリゴヌクレオチドの断片化を可能にする条件下で行われ；そして前記方法はさらに、検出できるようにラベルされたオリゴヌクレオチドの断片化を検出することを含んで成る。

10

本発明はまた、黄熱病ウィルスを検出するためのキットを提供する。前記キットは、配列番号56、57、58、59、60、61、62及び63から成る群から選択された配列を含んで成るオリゴヌクレオチドを含んで成る。いくつかの態様においては、オリゴヌクレオチドは、配列番号56、57、58、59、60、61、62及び63から成る群から選択される。

【0055】

いくつかの態様においては、キットはさらに、配列番号6又はその相補体にハイブリダイズする、検出できるようにラベルされたオリゴヌクレオチドを含んで成る。いくつかの態様においては、キットはさらに、配列番号25又はその相補体にハイブリダイズする、検出できるようにラベルされたオリゴヌクレオチドを含んで成る。いくつかの態様においては、キットはさらに、FGGTCTAGAIGGTTAGAGGAGACCCCTCCAGを含んで成る、検出できるようにラベルされたオリゴヌクレオチドを含んで成り、ここでFはCY5であり；IはFAMであり；PはPO<sub>4</sub>であり；Uはプロピニルduであり；そしてEは5 - メチル - dCである。

20

【0056】

いくつかの態様においては、反応混合物は、DNAポリメラーゼを含んで成る。いくつかの態様においては、反応混合物は、少なくとも1つの上流プライマー及び少なくとも1つの下流プライマーを含んで成る。

【0057】

本発明はまた、配列番号41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54及び55から成る群から選択された配列を含んで成るオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの態様においては、オリゴヌクレオチドは、配列番号41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54及び55から成る群から選択される。

30

本発明はまた、配列番号41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54及び55から成る群から選択された配列を含んで成るオリゴヌクレオチドを含んで成る反応混合物を提供する。いくつかの態様においては、オリゴヌクレオチドは、配列番号41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54及び55から成る群から選択される。

【0058】

いくつかの態様においては、反応混合物はさらに、配列番号16又はその相補体にハイブリダイズする、検出できるようにラベルされたオリゴヌクレオチドを含んで成る。いくつかの態様においては、反応混合物は、DNAポリメラーゼを含んで成る。いくつかの態様においては、反応混合物は、少なくとも1つの上流プライマー及び少なくとも1つの下流プライマーを含んで成る。

40

【0059】

本発明はまた、デング熱ウィルスを検出するための方法を提供する。いくつかの態様においては、前記方法は、配列番号41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54及び55から成る群から選択された配列を含んで成る少なくとも1つのオリゴヌクレオチドにより、デング熱ウィルスの核酸を、前記オリゴヌクレオチドからのヌクレオチド配列の少なくとも一部の増幅の開始を可能にする条件下で、増幅し；そしてその増幅された核酸を検出し、それにより、デング熱ウィルスを検出することを含んで成る。

【0060】

いくつかの態様においては、前記方法はさらに、配列番号16にハイブリダイズする、検

50

出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドを、増幅された Dengue 熱ウィルス核酸にハイブリダイズせしめ；そして増幅された核酸へのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することを含んで成る。いくつかの態様においては、オリゴヌクレオチドは、配列番号41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54及び55から成る群から選択される。

【0061】

いくつかの態様においては、核酸は、少なくとも1つの上流プライマー及び少なくとも1つの下流プライマーにより増幅される。いくつかの態様においては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、配列番号17又はその相補体の少なくとも20個の連続したヌクレオチドを含んで成る。いくつかの態様においては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、配列番号28又はその相補体を含んで成る。いくつかの態様においては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、蛍光成分を含んで成る。いくつかの態様においては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドはさらに、消光剤成分を含んで成る。

10

【0062】

いくつかの態様においては、オリゴヌクレオチドは、100個よりも少ないヌクレオチドを有する。いくつかの態様においては、増幅された核酸の量は、増幅段階の間に決定され、それにより、サンプル中のウィルスを定量化する。いくつかの態様においては、増幅段階は、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性を有する鋳型-依存性核酸ポリメラーゼを含んで成る増幅反応混合物において、前記鋳型-依存性核酸ポリメラーゼによる前記検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドの断片化を可能にする条件下で行われ；そして前記方法はさらに、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドの断片化を検出することを含んで成る。

20

【0063】

本発明はまた、Dengue 熱ウィルスを検出するためのキットを提供する。いくつかの態様においては、前記キットは、配列番号41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54及び55から成る群から選択された配列を含んで成るオリゴヌクレオチドを含んで成る。いくつかの態様においては、オリゴヌクレオチドは、配列番号41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54及び55から成る群から選択される。

【0064】

30

いくつかの態様においては、キットはさらに、配列番号16又はその相補体にハイブリダイズする、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドを含んで成る。いくつかの態様においては、反応混合物は、DNAポリメラーゼを含んで成る。

いくつかの態様においては、定量化段階は、内部又は外部対照核酸のいずれを用いて行われる。引用により本明細書に組込まれるアメリカ特許第5,476,774号及び第5,219,727号を参照のこと。

【発明を実施するための最良の形態】

【0065】

本発明の特定の記載：

1. 略語：

40

特定のヌクレオチド配列を含んで成る核酸を言及するために明細書を通して使用される略語は、従来の1文字略語である。従って、核酸に包含される場合、天然に存在するコードヌクレオチドは、次の通りに略される：アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)及びウラシル(U)。また、特にことわらない限り、一連の1文字略語として表される核酸配列は、5' 3' 方向で表される。

【0066】

2. 定義：

“増幅反応”とは、鋳型核酸配列の高められたコピー、又は鋳型の存在を示す高められたシグナルをもたらすいずれかの反応(例えば、化学的、酵素的又は他のタイプの反応)を言及する。増幅反応は、例えば、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)及びリガーゼ鎖反応(LCR)

50

(アメリカ特許第4,683,195号 及び第4,683,202号; PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications (Innisなど., eds, 1990)), 鎖置換増幅 (SDA) (Walker, など. Nucl. Acids Res. 20 (7): 1691-6 (1992); Walker PCR Methods Appl 3 (1) : 1-6(1993)), 転写 - 介在性 増幅 (Phyffer, など., J. Clin. Microbiol. 34: 834-841 (1996); Vuorinen, など., J. Clin. Microbiol. 33: 1856-1859 (1995)), 核酸配列に基づく増幅 (NASBA) (Compton, Nature 350 (6313): 91-2 (1991)), 回転塩増幅 (RCA) (Lisby, Mol. Biotechnol. 12 (1): 75-99 (1999)), Hatch など. Genet. Anal. 15 (2): 35-40 (1999)), 枝分かれ DNA シグナル増幅 (bDNA) (Iqbal など, Mol. Cell Probes 13 (4): 315-320 (1999)) 及び Q- レプリカーゼ (Lizardi など., Bio/Technology 6:1197 (1988)) を包含する。

10

#### 【0067】

“サンプル”とは、本明細書において使用される場合、核酸を含むか、又はそれを含むことが仮定されるいずれかの物質を言及する。サンプルは、天然又は合成起源のものであり、そして当業者に知られているいずれかの手段により得られる。サンプルは、個人から単離された組織又は流体、例えば皮膚、血漿、血清、完全な血液、脊髄液、卵巣、精液、リンパ液、髄液、尿、涙、血液細胞、器官、腫瘍、気管支 - 肺胞洗浄液、及びインビトロ細胞構成成分 (例えば、細胞培養培地における細胞、組換え細胞及び細胞成分の増殖に起因するならし培地) のサンプルであるが、但しそれらだけには限定されない。核酸は、当業者において知られているいずれかの方法により、生物学的サンプルから得られる。

#### 【0068】

20

用語“核酸”、“ポリペプチド”及び“オリゴヌクレオチド”とは、本明細書において使用される場合、プライマー、プローブ、検出されるべきオリゴマーフラグメント、オリゴマー対照及びラベルされていないブロックオリゴマーを言及し、そして一般的に、ポリデオキシリボヌクレオチド (2 - デオキシ - D - リボースを含む)、ポリリボヌクレオチド (D - リボースを含む)、及びプリン又はピリミジン塩基、又は修飾されたプリン又はピリミジン塩基のいずれか他のN - グリコシドの線状ポリマーである。

#### 【0069】

核酸、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル結合又は修飾された結合、例えばホスホトリエステル、ホスホラミデート、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチルエステル、アセトアミド、カルバメート、チオエーテル、架橋されたホスホラミデート、架橋されたメチレンホスホネート、ホスホロチオエーテル、メチルホスホネート、ホスホロジチオエーテル、架橋されたホスホロチオエーテル又はスルホン結合、及びそのような結合の組合せを含んで成るが、但しそれらだけには限定されない。

30

#### 【0070】

核酸、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、5種の生物学的に存在する塩基 (アデニン、グアニン、チミン、シトシン及びウラシル)、及び/又は前記5種の生物学的に存在する塩基以外の塩基を含んで成る。それらの塩基は、例えばハイブリダイゼーションを安定化するか、又は不安定化するために; プローブ分解を促進するか、又は阻害するために; 又は検出できる成分又は消光剤成分のための結合点として、多くの目的の役に立つ。

40

#### 【0071】

例えば、本発明のポリヌクレオチドは、1又は複数の修飾された、非標準の又は誘導体化された塩基成分、例えばN<sup>6</sup>-メチル-アデニン、N<sup>6</sup>-tert-ブチル-ベンジル-アデニン、イミダゾール、置換されたイミダゾール、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシルキユエオシン、イノシン、N<sup>6</sup>-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N<sup>6</sup>-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミ

50

ノメチルウラシル, 5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル, -D-マンノシルキユエオシン, 5'-メトキシカルボキシメチルウラシル, 5-メトキシウラシル, 2-メチルチオ-N<sup>6</sup>-イソペンテニルアデニン, ウラシル-5-オキシ酢酸(v), ワイブトキソシン, プソイドウラシル, キュエオシン, 2-チオシトシン, 5-メチル-2-チオウラシル, 2-チオウラシル, 4-チオウラシル, 5-メチルウラシル, ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル, 3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル, (acp3)w, 2,6-ジアミノプリン, 及び5-プロピニルピリミジンを包含するが、但しそれらだけには限定しない。

【0072】

修飾された、非標準のプロ又は誘導体化された塩基成分は、それぞれ引用により本明細書に組込まれるアメリカ特許第6,001,611号, 第5,955,589号, 第5,844,106号, 第5,789,562号, 第5,750,343号, 第5,728,525号, 及び第5,679,785号に見出される。

10

【0073】

さらに、核酸、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、1又は複数の修飾された糖成分、例えばアラビノース、2-フルオロアラビノース、キシロース及びヘキソースを含んで成るが、但しそれらだけには限定されない。

【0074】

本発明は核酸、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの源により制限されるものではない。核酸、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、ヒト又は非ヒト哺乳類、又はいずれか他の生物からであるか、又はインビトロ又は化学合成により合成されたいずれかの組換え源から誘導され得る。核酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、DNA, RNN, cDNA, DNA-RNA, ロックされた核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、ハイブリッド又はそのいずれかの混合物であり得、そして二本鎖、一本鎖又は部分的二本鎖形で存在することができる。核酸はまた、引用により本明細書に組込まれるアメリカ特許第5,696,248号に記載されるような誘導核酸でもあり得る。本発明の核酸は、遺伝子、染色体、プラスミド、生物学的材料、例えば微生物、例えば細菌、酵母、ウィルス、ウィロイド、カビ、菌類、植物、動物、ヒト及び同様のもののゲノムを包含する、精製された又は精製されていない形での核酸及びそのフラグメントの両者を包含する。

20

【0075】

用語、核酸、ポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド間で長さの意図された区別はなく、そしてそれらの用語は、交換可能的に使用されるであろう。それらの用語は、二本鎖又は一本鎖DNA、及び二本鎖及び一本鎖RNAを包含する。

30

用語“残基”とは、本明細書において使用される場合、上記に定義されるような核酸内のヌクレオチド又は塩基を言及する。残基は、当業者に知られているいずれかのヌクレオチド、例えば上記に記載される生物学的に存在するヌクレオチド及び生物学的に存在しないヌクレオチドであり得るが、但しそれらに制限されない。

【0076】

用語“プライマー”とは、鋳型鎖に対して相補的であるプライマー延長生成物の合成を可能にする条件下に配置される場合、鋳型核酸鎖に沿って、ポリヌクレオチド合成の開始点として作用することができるオリゴヌクレオチドを言及する。プライマーは、精製された制限フラグメントにおけるように、組換え源から得られるか、又は合成的に生成され得る。

40

【0077】

プライマー延長条件は典型的には、適切な緩衝液(“緩衝液”とは、補因子であるか、又はpH、イオン強度、等に影響を及ぼす置換基を包含することができる)において、及び適切な温度で、4種の異なったデオキシリボヌクレオチド三リン酸、及び重合活性を有する剤、例えばDNAポリメラーゼ又は逆転写酵素の存在を包含する。プライマーは好ましくは、増幅における最大の効能のための一本鎖である。本発明のプライマーは、例えば5~500個のヌクレオチドであり、そしていくつかの態様においては、少なくとも10, 20, 30, 25, 30, 40, 50, 75, 又は100個のヌクレオチドを有し、そして/又は500, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 又は20個よりも少ないヌクレオチドを有する。

50

## 【 0 0 7 8 】

用語“ハイブリダイズする”とは、一本鎖核酸、又は二本鎖核酸の局所的一本鎖領域の、相補的鎖を有する、もう1つの一本鎖核酸又は二本鎖核酸の局所的一本鎖領域への結合を言及する。当業者に明らかなように、お互いハイブリダイズするために完全に相補的であることが、2種の核酸鎖のために必要ではない。ハイブリダイゼーション条件に依存して、核酸は、1つの又は両鎖に少数の、いくつかの又は多くのミスマッチ、欠失又は付加が存在する場合でさえ、その相補体にハイブリダイズすることができる。ある態様においては、本発明のプライマー及びプローブは、下記に定義されるように、少なくとも部分的に相補的な核酸に選択的にハイブリダイズすることができる。ある態様においては、本発明のプライマー及びプローブは、下記に定義されるように、緊縮条件下で、少なくとも部分的に相補的な配列にハイブリダイズすることができる。

10

## 【 0 0 7 9 】

用語“緊縮”又は“緊縮条件”とは、本明細書において使用される場合、当業者に良く知られているように、低いイオン強度及び高い温度のハイブリダイゼーション条件を示す；Maniatis など. , 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Edition; Current Protocols in Molecular Biology, 1988, ed. Ausubel など., J. Wiley & Sons publ., New York, and Tijssen, 1993, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-- Hybridization with Nucleic Acid Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays,"を、参照のこと（それらの個々は引例により本明細書に組込まれる）。

20

## 【 0 0 8 0 】

一般的に、緊縮条件は、定義されるイオン強度及びpHで特定の配列に関して熱溶融点（ $T_m$ ）よりも約5～30 低いよう選択される。他方では、緊縮条件は、定義されるイオン強度及びpHで特定の配列に関して熱溶融点（ $T_m$ ）よりも約5～15 低いよう選択される。 $T_m$ は、標的物に対して相補的なプローブの50%が平衡で標的配列にハイブリダイズする（標的配列が過剰に存在する場合、 $T_m$ でプローブの50%が平均で支配される）、温度である（定義されるイオン強度、pH及び核酸濃度下で）。

## 【 0 0 8 1 】

例えば、緊縮ハイブリダイゼーション条件は、塩濃度が約1.0M以下のナトリウム（又は他の塩）イオン、約7.0～約8.3のpHで典型的には約0.01～約1Mのナトリウムイオン濃度であり、そして温度が、短いプローブ（例えば、10～50個のヌクレオチド）に関して、少なくとも約25 、及び長いプローブ（例えば、50個以上のヌクレオチド）に関して、少なくとも約55 であるそれらの条件である。緊縮条件はまた、ハイブリダイゼーション不安定化剤、例えばホルムアミドの添加により変性され得る。

30

## 【 0 0 8 2 】

用語“選択的”又は“選択的条件”とは、本明細書において使用される場合、検出できるフラビウシルス由来ではないか、又はフラビウシルスゲノムの無関係な領域由来の追加の核酸を含むことができるサンプルにおける検出できるフラビウシルス核酸の増幅、検出及び/又は定量化を可能にする本発明のプライマー及び/又はプローブについてのハイブリダイゼーション条件を示す。検出できるフラビウシルスは下記に記載されている。

40

## 【 0 0 8 3 】

核酸配列の“相補体”とは、本明細書において使用される場合、1つの配列の5'末端が他の配列の3'末端と対合されるよう核酸配列と一列整列される場合、逆平衡関係で存在するオリゴヌクレオチドを言及する。核酸配列の相補体は配列のあらゆるヌクレオチドと正確に適合する必要はなく；安定した重複体はミスマッチした塩基対又は適合しない塩基を含むことができる。核酸技術の当業者は、多くの変数、例えばオリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチドの塩基組成及び配列、イオン強度、及びミスマッチ塩基対の発生率を経験的に考慮することにより、重複体安定性を決定することができる。

核酸重複体の安定性は、溶融温度又は“ $T_m$ ”により測定される。特定される条件下での特定の核酸重複体の $T_m$ は、可能性ある塩基の半分が解離される温度である。

50



## 【0084】

用語“プローブ”とは、本明細書において使用される場合、核酸の領域における配列とプローブにおける少なくとも1つの配列との相補性のために、核酸の領域と共に重複体構造を形成するオリゴヌクレオチドを言及する。プローブは好ましくは、プライマーの配列に対して相補的な配列を含まない。下記に論じられるように、プローブはラベルされても又はされなくても良い。プローブの3'末端は、プライマー延長生成物中へのプローブの組込みを阻害するために、“ブロック”され得る。

## 【0085】

“ブロッキング”は、非相補的塩基を用いることにより、又は選択された成分に依存して、ラベルに結合される核酸の続く検出又は捕獲のためのラベルとして、また作用することにより、二重目的にかなう、最後のヌクレオチドの3'ヒドロキシルに、化学成分、例えばピオチン又はホスフェート基を付加することにより達成される。ブロッキングはまた、3'ヒドロキシルを除くことにより、又は3'ヒドロキシルを欠いているヌクレオチド、例えばジデオキシヌクレオチドを用いることにより達成され得る。

## 【0086】

用語“検出できる成分”とは、本明細書において使用される場合、検出できる（任意には、定量化できる）シグナルを供給するために使用され得、そして核酸又はタンパク質に結合され得るいずれかの原子又は分子を言及する。検出できる成分は、蛍光、放射能、比色法、重力法、X-線回折又は吸収、磁気法、酵素活性及び同様の方法により検出できるシグナルを提供することができる。本発明のための便利な検出できる成分は、オリゴヌクレオチドフラグメントのサイズの検出を促進するそれらの成分を包含する。

## 【0087】

用語“蛍光成分”とは、本明細書において使用される場合、特定成分のために適切な条件下で光を放すことができる化学成分を言及する。典型的には、特定の蛍光成分は、短い波長の光の吸収に続いて特定の波長の光を放すことができる。特定の蛍光成分により放される光の波長は、その成分の特徴である。従って、特定の蛍光成分は、短い波長の光を有する蛍光成分の励起に続いて、適切な波長の光を検出することにより検出され得る。本発明の方法及び組成物に使用され得る蛍光成分の例は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：フルオレセイン-ファミリー色素、ポリハロフルオレセイン-ファミリー色素、ヘキサクロロフルオレセイン-ファミリー色素、ローダミン-ファミリー色素、シアニン-ファミリー色素、オキサジン-ファミリー色素、チアジン-ファミリー色素、スクアライン-ファミリー色素、キレート化されたランタニド-ファミリー色素及びBODIPY（商標）-ファミリー色素。

## 【0088】

用語“消光剤成分”（quencher moiety）とは、本明細書において使用される場合、消光剤成分が蛍光成分に十分に接近している場合、例えば消光剤及び蛍光成分の両者が通常のポリヌクレオチドに連結される場合、蛍光成分により放されるエネルギーを吸収できる化学成分を言及する。この現象は一般的に、蛍光共鳴エネルギー移行（“FRET”）として当業界において知られている。消光剤成分は、その消光剤成分のための特徴的なシグナルで蛍光成分から吸収されるエネルギーを再び放すことができ、そして従って、消光剤はまた、“蛍光成分”であり得る。他方では、消光剤成分は、熱として蛍光成分から吸収されるエネルギーを散逸することができる。

## 【0089】

“5' 3'ヌクレアーゼ活性”又は“5'ヌクレアーゼ活性”とは、本明細書において使用される場合、酵素の活性を言及し、それにより、ヌクレオアーゼが連続的態様でオリゴヌクレオチドの5'末端から除去される。5'ヌクレアーゼ活性は、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性又は5' 3'エンドヌクレアーゼ活性であり得る。例えば、多くの鋳型-特異的核酸ポリメラーゼは、従来、いくつかのDNAポリメラーゼにより結合される5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を示す（すなわち、E. コリDNAポリメラーゼIはこの活性を有し、そしてE. コリDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントはこの活性を有さない）。5'

3' エキソヌクレアーゼ活性はまた、基質の5' 末端から1つよりも多くのホスホジエステル結合の基質核酸(ヌクレオチド)を分解することができる。

【0090】

操作のいずれかの特定の理論により拘束されないが、プローブからの分解されたオリゴヌクレオチドフラグメントの開放を導く、DNAポリメラーゼにより結合される5' 3' エキソヌクレアーゼ活性のこの観点、プローブの特定のヌクレオチド組成に依存することができると思われる。例えば、特にオリゴヌクレオチドの5' 末端で、オリゴヌクレオチドのヌクレオチドと鋳型核酸との間の適正又は不適正の数は、例えば、引用により本明細書に組込まれるHolland など., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7276-80により記載されるように、この活性に影響を及ぼすことができる。

10

【0091】

用語“対照(control)5'ヌクレアーゼ反応”とは、本明細書において使用される場合、検出できるフラビウスの既知量、例えばコピー数の核酸に対して、下記のようにして行われる5'ヌクレアーゼ反応を言及する。そのような反応により放される蛍光の量が、日本脳炎ウイルス血清グループの未知の量の核酸を有するサンプルに対して行われる反応に、サンプルに存在するそのような核酸の量を評価するために、比較され得る。

【0092】

用語“隣接した”とは、本明細書において使用される場合、鋳型核酸の同じ鎖又は相補的鎖上でのプローブに対してのプライマーの位置決定を言及する。プライマー及びプローブは、約150個以上のヌクレオチド、約125個以上のヌクレオチド、約100個以上のヌクレオチド、約80個以上のヌクレオチド、約60個以上のヌクレオチド、約50個以上のヌクレオチド、約40個以上のヌクレオチド、約30個以上のヌクレオチド、約20個以上のヌクレオチド、約1~約20個のヌクレオチド、約1~約10個のヌクレオチドにより分離され得るか、又はお互い直接的に隣接することができる。

20

【0093】

重合無関係の方法によりフラビウス核酸を検出することが所望される場合、プローブは好ましくは、約1~約10個のヌクレオチドから分離される。重合-依存性方法、例えば本明細書に教授されるPCR増幅及び検出方法においては、プローブは、プライマーの下流に存在する、増幅されるべき配列内のいずれかにおける検出できる核酸にハイブリダイズすることができ、従ってプローブが断片化されるよう、ポリメラーゼのプライマー延長による位置決定を可能にする。

30

【0094】

用語“熱安定性核酸ポリメラーゼ”とは、例えば、E. コリからのヌクレオチドポリメラーゼに比較される場合、熱に対して比較的安定性であり、そしてヌクレオシド三リン酸の重合を触媒スル酵素を言及する。一般的に、そのような酵素は、好熱性生物であることが当業者により考慮される生物から得られる。一般的に、酵素は、プライマー結合配列にアニーリングされるプライマーの3' 末端での合成を開始し、そして鋳型の5' 末端に対しての新規鎖の合成を続けるであろう。

【0095】

ポリメラーゼが5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する場合、それは、重合が終結するか、又はすべてのプローブフラグメントが検出されるべき核酸から解離するまで、ラベルされた及びラベルされていないプローブフラグメントの両者を解放するよう、鋳型にアニーリングされた介在性プローブを加水分解することができる。サーマス・アクアチカス(Thermus aquaticus)(Taq)から単離された代表的な熱安定性酵素は、アメリカ特許第4,889,818号に記載され、そして従来のPCRにそれを用いるための方法は、Saikiなど., 1988, Science 239: 487-91に記載されている。もう1つの代表的な熱安定性酵素は、サーマス種Z05 DNAポリメラーゼを包含する。アメリカ特許第5,674,738号を参照のこと。

40

【0096】

Taq DNAポリメラーゼは、DNA合成-依存性鎖置換5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する(Gelfand, "Taq DNA Polymerase" in PCR Technology Principles and Applications

50

for DNA Amplification, Erlich, Ed., Stockton Press, N. Y. (1989), Chapter 2を参照のこと)。従って、Taq DNAポリメラーゼは、それが鋳型DNAに結合されない場合、プローブを分解しない。

【 0 0 9 7 】

用語、核酸プライマー又はプローブの“5'ヌクレアーゼ反応”とは、プライマーが上記に定義され、そして下記に詳細に記載されるように、5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する核酸ポリメラーゼにより延長される場合、核酸ハイブリダイズされるプローブの分解を言及する。そのような反応は、引用により本明細書に組込まれる、アメリカ特許第6,214,979号、第5,804,375号、第5,487,972号及び第5,210,015号に記載されるそれらに基づかれている。

10

【 0 0 9 8 】

2種の核酸配列の“%相補性”又は“%同一性”を決定するために、配列は最適な比較目的のために一列整列される（例えば、ギャップが、第2の核酸配列との最適な一列整列のために、第1の核酸配列の配列に導入され得る）。次に、対応するヌクレオチド位置でのヌクレオチドが比較される。第1の配列における位置が第2の配列におけるその対応する位置として相補的ヌクレオチドにより支配される場合、分子はその位置で相補的である。同様に、第1の配列における位置が第2の配列における対応する位置と同じヌクレオチドにより支配される場合、ヌクレオチドはその位置で同一である。2種の配列間の%相補性（又は%同一性）は、比較される位置の合計数により割り算された、配列により共有される相補的位置（又は同一の位置）の数の関数である（すなわち、%相補性 = 相補的オーバーラッピング位置の数/より短いヌクレオチドの位置の合計数 × 100%；及び%同一性 = 同一のオーバーラッピング位置/より短いヌクレオチドの位置の合計数 × 100%）。

20

【 0 0 9 9 】

2種の配列間の%同一性の決定はまた、数学的アルゴリズムを用いて達成され得る。2種の配列の比較のために使用される数学的アルゴリズムの非制限例は、Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 5873-5877におけるように修飾された、Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87: 2264-2268のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、Altschulなど、1990, J. Mol. Biol. 215: 403のNBLASTプログラムに組込まれている。

【 0 1 0 0 】

本発明の実施は、特に断らない限り、当業者に知られている、分子生物学、微生物学及び組換えDNA技法を用いるであろう。そのような技法は、文献において十分に説明されている。例えば、Sambrook など、2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning (B. Perbal, 1984); and a series, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.)を参照のこと。

30

【 0 1 0 1 】

3. 日本脳炎血清グループのメンバー及び他のフラビウスの核酸を検出するための核酸プライマー及びプローブ：

40

本発明は、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバー及びフラビウス属の他のメンバーの核酸の存在を検出するためにプライマー及びプローブとして有用なオリゴヌクレオチド、及びそれらの使用方法を提供する。それらのプライマー及びプローブは、下記に詳細に記載されている。本明細書に論じられるプライマーは特定のウイルス型（例えば、西ナイル熱ウイルス、SLEV、デング熱ウイルス、黄熱病ウイルス、等）を増幅するために特に有用であるものとして企画され得るが、プライマーは他のウイルスを同様に増幅するためにも有用であることが注目される。

【 0 1 0 2 】

本発明の方法において有用なオリゴヌクレオチドは、フラビウスの異なった株間に

50

保存されるか、又は日本脳炎ウィルス血清グループの複数メンバー又はフラビウィルス属の他のメンバー間に保存される、ヌクレオチド配列、又はその相補体を含んで成るように企画され得る。血清グループ又は属の異なった株又はメンバー間に保存される配列を含んで成るオリゴヌクレオチドは、例えば異なった株又はメンバーを検出するために使用され得るプライマー又はプローブとして有用であり、それにより、異なった株又はメンバーを検出するために必要なプライマー又はプローブのメンバーを減じる。

#### 【 0 1 0 3 】

保存された配列は、例えば日本脳炎ウィルス血清グループの複数の株又は複数のメンバー、又はフラビウィルス属の他のメンバー間で完全に（すなわち、100%）又は実質的に同一である、少なくとも5,6, 7,8, 9,10,11, 12,13, 14,15, 16,17, 18,19, 20,21, 22,23, 24,25, 30,40, 50、又はそれ以上の連続したヌクレオチドを含む。実質的に同一の配列は、上記に列挙される連続ヌクレオチドを通して、複数の株間で、80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%,94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 又は99%同一であるそれらの配列を含む。

#### 【 0 1 0 4 】

##### 3 . 1 . 核酸プライマー :

配列番号 1 に基づくプライマー :

1つの観点においては、本発明は日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの検出方法において使用され得る核酸プライマーを提供する。ある態様においては、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーを検出するために使用され得る第1の核酸プライマーは、配列番号1又はその相補体の核酸にハイブリダイズする核酸を含んで成る。図1に提供されるような配列番号1は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され得るフラビウィルスのゲノムの3' 未翻訳領域における保存された配列の領域を表わす。配列番号2は、配列番号1に対する相補体を表わす。

#### 【 0 1 0 5 】

本発明のそのような態様においては、第1の核酸プライマーは、配列番号1の核酸への定義される条件下でのハイブリダイゼーションを可能にするヌクレオチド組成物、すなわち化学構造体を有する。いくつかの場合、核酸にハイブリダイズするプライマーの個々のヌクレオチドは、核酸のヌクレオチドと共に塩基対相補体を形成するであろう。例えば、配列番号1の核酸におけるC残基にハイブリダイズする標準ヌクレオチドを含むプライマーは、その対応する位置にG残基を有するべきである。従って、配列番号1の核酸へのハイブリダイゼーションは、ヌクレオチド配列、及び従って、プライマーの正確な化学構造を定義する。

#### 【 0 1 0 6 】

さらに、第1の核酸プライマーはまた、上記に引用されるオリゴヌクレオチド及びプライマーの定義に従って非標準のヌクレオチドを含んで成る。そのような非標準のヌクレオチドはまた、塩基対を形成するために、他の標準又は非標準のヌクレオチドに結合することができる。例えば、非標準のヌクレオチドイノシンはウラシル、シトシン及びアデニンと対合することができる。例えば、非標準のヌクレオチドは、ウラシル、シトシン及びアデニンと対合することができる。ハイブリダイゼーションと化学構造との間の既知の相互関係が与えられる場合、当業者は本発明のプライマーの標準特徴を容易に認識することができる。典型的な態様が下記に詳細に記載される。

#### 【 0 1 0 7 】

ある態様においては、配列番号1の核酸にハイブリダイズする第1の核酸プライマーは、約6個の短いヌクレオチドとして存在する。他の態様においては、第1の核酸プライマーは、約80個の長さのヌクレオチドであり得る。ある態様においては、第1の核酸プライマーは、約10個、約12個、約14個、約15個、約16個、約17個、約18個、約19個、約20個、約21個、約22個、約23個、約24個、約25個、約26個、約27個、約28個、約29個、約30個、約35個、又は約40個のヌクレオチドを含んで成る。いくつかの態様においては、第1の核酸プライマーは、100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 21 又は 20よりも少ないヌクレオチドを含んで成る。

## 【0108】

プライマーの長さ及び組成は、行われる検出方法に依存する適切な反応条件下でフラビウイルス核酸へのプライマーのハイブリダイゼーションを確保するための十分な熱力学的安定性を与えるために選択され得る。例えば、修飾された非標準の又は誘導体化されたヌクレオチドを有するプライマーは、類似する熱力学的ハイブリダイゼーション性質を有すると共に、従来のヌクレオチドを有するそれらのプライマーよりも長い又は短い。そのような非標準の塩基の例は、引用により本明細書に組込まれる、アメリカ特許第6,320,005号、第6,174,998号、第6,001,611号及び第5,990,303号に見出され得る。もう1つの例として、G/Cに富んでいる配列を有するプライマーは、A/Tに富んでいる配列を有する類似する長さのプライマーよりも高い温度で標的配列にアニーリングすることができる。従って、ある態様においては、第1の核酸プライマーは、上記に定義されるように、修飾された、非標準の又は誘導体化された塩基を含んで成る。

10

## 【0109】

ある態様においては、第1の核酸プライマーは、配列番号2の少なくとも約16個の連続ヌクレオチドを含んで成る。図1に示されるように、配列番号2は、配列番号1に対して相補的である。他の態様においては、第1の核酸プライマーは、配列番号2の少なくとも約18個の連続ヌクレオチドを含んで成る。さらに他の態様においては、第1の核酸プライマーは、配列番号2の少なくとも約20個の連続ヌクレオチドを含んで成る。さらに他の態様においては、第1の核酸プライマーは、配列番号2の少なくとも約22個の連続ヌクレオチドを含んで成る。さらに他の態様においては、第1の核酸プライマーは、配列番号2の少なくとも約24個の連続ヌクレオチドを含んで成る。

20

## 【0110】

ある態様においては、本発明は、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーを検出するために使用され得る核酸プライマーを提供する。それらのプライマーは、表1に表わされるように、それらの核酸配列を参照して構造的に定義され得る。

## 【0111】

【表 1】

表 1	
配列番号 3 : 日本脳炎ウィルス血清グループプライマー 1	GN <sup>2</sup> AAN <sup>5</sup> CCN <sup>8</sup> N <sup>9</sup> N <sup>10</sup> CN <sup>12</sup> N <sup>13</sup> AN <sup>15</sup> CN <sup>17</sup> N <sup>18</sup> N <sup>19</sup> N <sup>20</sup> TCGCGN <sup>25</sup> N <sup>26</sup> ここで、N <sup>2</sup> は T 又は A であり; N <sup>5</sup> は G 又は C であり; N <sup>8</sup> は T であるか又は不在であり; 位置 9 での N は C 又は G であり; N <sup>10</sup> は T 又は C であり; N <sup>12</sup> は A 又は G であり; N <sup>13</sup> は G 又は A であり; N <sup>15</sup> は A 又は C であり; N <sup>17</sup> は C 又は T であり; N <sup>18</sup> は G 又は C であり; N <sup>19</sup> は T 又は C であり; N <sup>20</sup> は C 又は T であり; N <sup>25</sup> は A 又は G であり; そして N <sup>26</sup> は A 又は T である。
配列番号 4 : 西ナイル熱ウィルスプライマー 1	GTAAGCCN <sup>8</sup> CN <sup>10</sup> CAGAACCGN <sup>19</sup> N <sup>20</sup> TCGGAA ここで N <sup>8</sup> は不在であるか、又は T であり; N <sup>10</sup> は T 又は C であり; N <sup>19</sup> は T 又は C であり; そして N <sup>20</sup> は C 又は T である。
配列番号 5 : 日本脳炎ウィルス血清グループプライマー 1	GAAAN <sup>5</sup> CCN <sup>8</sup> CTCN <sup>12</sup> N <sup>13</sup> AACN <sup>17</sup> GTN <sup>20</sup> TCGGAA ここで N <sup>5</sup> は G 又は C であり; N <sup>8</sup> は不在であり; N <sup>12</sup> は A 又は G であり; N <sup>13</sup> は G 又は A であり; N <sup>17</sup> は C 又は T であり; そして N <sup>20</sup> は C 又は T である。
配列番号 6 : マリーバレー脳炎ウィルスプライマー 1	GAAAGCCTCCAGAN <sup>15</sup> CCGTN <sup>20</sup> TCGGAA ここで N <sup>15</sup> は A 又は C であり; そして N <sup>20</sup> は C 又は T である。
配列番号 7 : Koutango ウィルス	GTAAGCCCTCAGAACCGTCTCGGAA
配列番号 8 : 例プライマー 1	GTAAGCCCTCAGAACCGTCTCGGAA
配列番号 11 : 日本脳炎ウィルス血清グループプライマー 2	N <sup>1</sup> CCN <sup>4</sup> AN <sup>6</sup> TN <sup>8</sup> TN <sup>10</sup> N <sup>11</sup> N <sup>12</sup> N <sup>13</sup> CCAGGTN <sup>20</sup> TCAA ここで N <sup>1</sup> は T 又は C であり; N <sup>4</sup> は C 又は T であり; N <sup>6</sup> は G 又は C であり; N <sup>8</sup> は C 又は A であり; N <sup>10</sup> は A 又は T であり; N <sup>11</sup> は不在であるか又は T であり; N <sup>12</sup> は T 又は C であり; N <sup>13</sup> は C 又は T であり; そして N <sup>20</sup> は G 又は A である。
配列番号 12 : 西ナイル熱プライマー 2	N <sup>1</sup> CCTAGTCTATCCAGGTN <sup>19</sup> TCAA N <sup>1</sup> は T 又は C であり、そして N <sup>19</sup> は G 又は A である。
配列番号 13 : 日本脳炎ウィルス血清グループプライマー 2	CCCN <sup>4</sup> AN <sup>6</sup> TN <sup>8</sup> TNTN <sup>12</sup> N <sup>13</sup> CCAGGTGTCAA ここで N <sup>4</sup> は C 又は T であり; N <sup>6</sup> は G 又は C であり; N <sup>8</sup> は C 又は A であり; N <sup>12</sup> は T 又は C であり; そして N <sup>13</sup> は C 又は T である。
配列番号 14 : マリーバレー脳炎ウィルスプライマー 2	TCCTAGTCTTTTCCAGGTGTCAA
配列番号 15 : 例プライマー 2	TCCTAGTCTATCCAGGTGTCAA
配列番号 74 : 例プライマー 2	TCTCCTAGTCTATCCAGGTGTCAA

## 【 0 1 1 2 】

ある態様においては、第 1 の核酸プライマーは、配列番号 3 ~ 8 のいずれかを含んで成る。本発明のある態様においては、プライマー特異性を改良するために、そのプライマーはその 3' 末端で又はその近くで 1 又は複数のアルキル化されたヌクレオチドを含んで成る。例えば、ある態様においては、第 1 の核酸プライマーは配列番号 8 を含んで成り、ここで位置 23 での残基は N<sup>6</sup> - アルキル - デオキシアデノシンである。特定の態様においては

10

20

30

40

50

、第1の核酸プライマーは配列番号8を含んで成り、ここで位置23での残基はN<sup>6</sup>-メチルデオキシアデノシンである。ある態様においては、第1の核酸プライマーは配列番号8を含んで成り、ここで位置24での残基はN<sup>6</sup>-アルキル-デオキシアデノシンである。特定の態様においては、第1の核酸プライマーは配列番号8を含んで成り、ここで位置24での残基はN<sup>6</sup>-tert-ブチル-ベンジル-デオキシアデノシンである。

【0113】

ある態様においては、第1の核酸プライマーは配列番号8を含んで成り、ここで位置23での残基はN<sup>6</sup>-アルキル-デオキシアデノシンであり、そして位置24での残基はN<sup>6</sup>-アルキル-デオキシアデノシンである。さらにもう1つの特定の態様においては、第1の核酸プライマーは配列番号8を含んで成り、ここで位置23での残基はN<sup>6</sup>-メチル-デオキシアデノシンであり、そして位置24での残基はN<sup>6</sup>-tert-ブチル-ベンジル-デオキシアデノシンである。上記引例により組込まれるアメリカ特許第6,001,611号は、N<sup>6</sup>-アルキル-デオキシアデノシン、及びそのような非標準のヌクレオチドにより使用され得るアルキル成分の同一性を記載する。例えば、ある態様においては、アルキル成分は、C<sub>1</sub>~約C<sub>10</sub>の枝分かれ鎖又は枝なし鎖のアルキルを含んで成る。他の態様においては、アルキル成分は、C<sub>1</sub>~約C<sub>20</sub>の枝分かれ鎖又は枝なし鎖のアルキルを含んで成る。

【0114】

もう1つの観点においては、本発明は、配列番号9又はその相補体の核酸にハイブリダイズする核酸を含んで成る、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーを検出するための第2の核酸プライマーを提供する。図2に表わされるような配列番号9は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され得るフラビウィルスのゲノムの3'末翻訳領域に保存された配列の領域を表わす。図2はまた、配列番号10が配列番号9に対する相補体を表わすことも示す。

【0115】

本発明のそのような態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号9の核酸へのハイブリダイゼーションを可能にするヌクレオチド組成物、すなわち化学構造体を有する。例えば、配列番号9の核酸におけるC残基にハイブリダイズする標準ヌクレオチドを含むプライマーは、その対応する位置にG残基を有するべきである。従って、配列番号9の核酸へのハイブリダイゼーションは、ヌクレオチド配列、及び従って、プライマーの正確な化学構造を定義する。

【0116】

さらに、第2の核酸プライマーはまた、上記に引用されるオリゴヌクレオチド及びプライマーの定義に従って非標準のヌクレオチドを含んで成る。そのような非標準のヌクレオチドはまた、塩基対を形成するために、他の標準又は非標準のヌクレオチドに結合することができる。例えば、非標準のヌクレオチドイノシンはウラシル、シトシン及びアデニンと対合することができる。例えば、非標準のヌクレオチドは、ウラシル、シトシン及びアデニンと対合することができる。ハイブリダイゼーションと化学構造との間の既知の相互関係が与えられる場合、当業者は本発明のプライマーの標準特徴を容易に認識することができる。典型的な態様が下記に詳細に記載される。

【0117】

ある態様においては、配列番号9の核酸にハイブリダイズする第2の核酸プライマーは、約6個の短いヌクレオチドとして存在する。他の態様においては、第2の核酸プライマーは、約80個の長さのヌクレオチドであり得る。ある態様においては、第2の核酸プライマーは、約10個、約12個、約14個、約15個、約16個、約17個、約18個、約19個、約20個、約21個、約22個、約23個、約24個、約25個、約26個、約27個、約28個、約29個、約30個、約35個、又は約40個のヌクレオチドを含んで成る。

【0118】

プライマーの長さ及び組成は、行われる検出方法に依存する適切な反応条件下でフラビウィルス核酸へのプライマーのハイブリダイゼーションを確保するための十分な熱力学的安定性を与えるために選択され得る。例えば、修飾された非標準の又は誘導体化されたヌ

10

20

30

40

50

クレオチドを有するプライマーは、類似する熱力学的ハイブリダイゼーション性質を有すると共に、従来のヌクレオチドを有するそれらのプライマーよりも長い又は短い。そのような非標準の塩基の例は、引用により本明細書に組込まれる、アメリカ特許第6,320,005号、第6,174,998号、第6,001,611号及び第5,990,303号に見出され得る。もう1つの例として、G/Cに富んでいる配列を有するプライマーは、A/Tに富んでいる配列を有する類似する長さのプライマーよりも高い温度で標的配列にアニーリングすることができる。従って、ある態様においては、第1の核酸プライマーは、上記に定義されるように、修飾された、非標準の又は誘導体化された塩基を含んで成る。

【0119】

ある態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号10の少なくとも約16個の連続ヌクレオチドを含んで成る。図2に示されるように、配列番号10は、配列番号9に対して相補的である。他の態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号10の少なくとも約18個の連続ヌクレオチドを含んで成る。さらに他の態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号10の少なくとも約20個の連続ヌクレオチドを含んで成る。さらに他の態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号10の少なくとも約22個の連続ヌクレオチドを含んで成る。さらに他の態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号10の少なくとも約24個の連続ヌクレオチドを含んで成る。

【0120】

ある態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号11を含んで成る。他の態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号12を含んで成る。さらに他の態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号13を含んで成る。さらに他の態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号14を含んで成る。さらに他の態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号15又は74を含んで成る。ある態様においては、第2の核酸プライマーは、非標準の又は誘導体化されたヌクレオチドを含んで成る。他の態様においては、第2の核酸プライマーは、その3'末端で又はその近くで1又は複数のアルキル化されたヌクレオチドを含んで成る。

【0121】

ある態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号15又は74を含んで成り、ここで位置24での残基はN<sup>6</sup>-アルキル-デオキシアデノシンである。ある態様においては、前記アルキル成分は、C<sub>1</sub>-約C<sub>10</sub>の枝分かれ鎖又は枝なし鎖のアルキルを含んで成る。他の態様においては、アルキル成分は、C<sub>1</sub>-約C<sub>20</sub>の枝分かれ鎖又は枝なし鎖のアルキルを含んで成る。特定の態様においては、第2の核酸プライマーは、配列番号15又は74を含んで成り、ここで位置24での残基はN<sup>6</sup>-tert-ブチル-ベンジル-デオキシアデノシンである。

【0122】

本発明の核酸プライマーはさらに、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーに対して相補体的でなく、そして/又はそれに対してハイブリダイズしない核酸配列を含んで成ることができる。それらの追加の配列は、例えば日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの検出を助けるために、当業者により選択され得る。日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を包含する、核酸の検出方法は、下記セクション4.2及び4.3に集中的に記載される。それらの方法は、本発明の核酸プライマーに存在することができる追加の核酸配列、及び日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーを検出するためへのそれらの追加の配列の使用法の両者を記載する。

【0123】

核酸プライマーは、当業者に知られているいずれかの適切な方法により調製され得る。定義される配列のオリゴヌクレオチドの調製方法は、当業界に良く知られており、そして例えば、適切な配列のクローニング及び制限、及び直接的な化学合成を包含する。化学合成方法は、例えばNarangなど、1979, Methods in Enzymology 68: 90により記載されるホスホトリエステル方法、Brown など、1979, Methods in Enzymology 68: 109により開示されるホスホジエステル方法、Beaucage など、1981, Tetrahedron Letters 22: 1859

10

20

30

40

50



に開示されるジエチルホスホラミデート方法、及びアメリカ特許第4,458,066号に開示される固体支持方法を包含することができる。

【 0 1 2 4 】

さらに、上記合成方法への改良は、合成されるオリゴヌクレオチドに関して酵素挙動性に影響を及ぼすために使用され得る。例えば、修飾されたホスホジエステル結合（例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホアミデート又はボラノホスフェート）、又はリン酸誘導体以外の結合のオリゴヌクレオチド中の組込みが、選択された部位での分解を妨げるために使用され得る。さらに、2'-アミノ修飾された糖の使用は、新規核酸鎖の合成のための鋳型でもある核酸にハイブリダイズされる場合、オリゴヌクレオチドの消化よりも置換を好む傾向がある。

10

【 0 1 2 5 】

デング熱ウィルスプライマー：

本発明の追加のプライマーは、デング熱ウィルス3' UTRにハイブリダイズする。デング熱ウィルス核酸の増幅及び/又は検出のために有用な典型的なプライマーは、表2に示されるそれらを包含する（5' 3'）。

【 0 1 2 6 】

【表2】

表2：

配列	説明	配列番号
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAAGAA	デング熱ウィルスコンセンサス上流プライマー	41
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAAGAJ	デング熱ウィルスコンセンサス上流プライマー	42
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAAGEJ	デング熱ウィルスコンセンサス上流プライマー	43
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAATGAA	デング熱ウィルスI型上流プライマー	44
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAATGAJ	デング熱ウィルスI型上流プライマー	45
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAATGEJ	デング熱ウィルスI型上流プライマー	46
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAAGAA	デング熱ウィルスII及びIII型上流プライマー	47
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAAGAJ	デング熱ウィルスII及びIII型上流プライマー	48
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAAGEJ	デング熱ウィルスII及びIII型上流プライマー	49
ATTGAAGTCAGGCCACTTGTGCCA	デング熱ウィルスIV型上流プライマー	50
ATTGAAGTCAGGCCACTTGTGCCJ	デング熱ウィルスIV型上流プライマー	51
ATTGAAGTCAGGCCACTTGTGCUJ	デング熱ウィルスIV型上流プライマー	52
GATCTCTGGTCTTTCCAGCGTCAA	デング熱ウィルス下流プライマー	53
GATCTCTGGTCTTTCCAGCGTCAJ	デング熱ウィルス下流プライマー	54
GATCTCTGGTCTTTCCAGCGTCEJ	デング熱ウィルス下流プライマー	55

20

30

40

プライマー接尾語の定義：J=ｔ-ブチル-ベンジル-dA；E=メチル-dA；U=エチル-dC

【 0 1 2 7 】

いくつかの態様においては、1つの“上流”プライマー及び“下流”プライマーは、デング熱ウィルス核酸を増幅するために組合して使用される。いくつかの態様においては、1つ以上のプライマーが、1又は複数のデング熱ウィルス核酸を検出するために少なくとも1つの下流プライマーと組合して使用される。単一の増幅反応への複数の上流プライマーの使用は、異なったデング熱ウィルス核酸変異体の増幅及び/又は検出を可能にする。

50

例えば、いくつかの態様においては、第1の上流プライマー（配列番号41、42及び43から選択される）及び第2の上流プライマー（配列番号50、51及び52から選択される）は、デング熱ウィルス下流プライマー（例えば、配列番号53、54及び55を含んで成るプライマーから選択される）と組合して使用される。それらの態様は、例えばデング熱ウィルス1，2，3又は4型のいずれかを検出するために有用である。

【0128】

黄熱病ウィルスプライマー：

本発明の追加のプライマーは、黄熱病ウィルス3' UTRにハイブリダイズする。黄熱病ウィルス核酸の増幅及び/又は検出のために有用な典型的なプライマーは、表3に示されるそれらを包含する（5' 3'）。

【0129】

【表3】

表3：

配列	説明	配列番号
AACCGGATAAAACTACGGGTGGAGAA	黄熱病ウィルス上流プライマー	56
AACCGGATAAAACTACGGGTGGAGAJ	黄熱病ウィルス上流プライマー	57
AACCGGATAAAACTACGGGTGGAGEJ	黄熱病ウィルス上流プライマー	58
ATAAAACTACGGGTGGAGAACCGGA	黄熱病ウィルス上流プライマー	59
ATAAAACTACGGGTGGAGAACCGGJ	黄熱病ウィルス上流プライマー	60
ACTCCGGTCTTTCCTGGCGTCAA	黄熱病ウィルス下流プライマー	61
ACTCCGGTCTTTCCTGGCGTCAJ	黄熱病ウィルス下流プライマー	62
ACTCCGGTCTTTCCTGGCGTCEJ	黄熱病ウィルス下流プライマー	63

接尾語は、表2を参照のこと。

【0130】

いくつかの態様においては、1つの“上流”プライマー及び“下流”プライマーは、黄熱病ウィルス核酸を増幅するために組合して使用される。いくつかの態様においては、1つ以上のプライマーが、1又は複数の黄熱病ウィルス核酸を検出するために少なくとも1つの下流プライマーと組合して使用される。複数の上流プライマーが、単一の増幅反応に使用され得る。例えば、いくつかの態様においては、第1の上流プライマー（配列番号56、57及び58から選択される）及び第2の上流プライマー（配列番号59、60及び61から選択される）は、黄熱病ウィルス下流プライマー（例えば、配列番号62及び63を含んで成るプライマーから選択される）と組合して使用される。

【0131】

図7の配列に基づくプライマー：

本発明の追加のプライマーは、図7に示される配列（例えば、配列番号29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40）、又はその相補体のいずれかに、増幅反応のプライミングを可能にする条件下でハイブリダイズする。いくつかの場合、それらのプライマーは、SLEVからの核酸の増幅及び/又は検出のために有用である。

上記に記載される配列番号1にハイブリダイズするプライマーと同様に、図7に示される配列のいずれかにハイブリダイズするプライマーはまた、上記に引用されるオリゴヌクレオチド及びプライマーの定義に従って非標準のヌクレオチドを、包含することができる。

【0132】

図7に示される配列のいずれかにハイブリダイズするプライマーの長さ及び組成が、実

10

20

30

40

50

施される検出方法に依存する適切な反応条件下でのフラビウィルス核酸へのプライマーのハイブリダイゼーションを確保するために十分な熱力学的安定性を付与するよう選択され得る。例えば、修飾され、非標準の又は誘導体化されたヌクレオチドを有するプライマーは、類似する熱力学的ハイブリダイゼーション性質を有すると共に、従来のヌクレオチドを有するそれらのプライマーよりも長い又は短い。従って、ある態様においては、第2の核酸プライマーは、上記に定義されるような、修飾され、非標準の又は誘導体化された塩基を含んで成る。図7に示される配列のいずれかにハイブリダイズするプライマーは、図7に示される配列又はその相補体のいずれかの少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、40、50個又はそれ以上の連続したヌクレオチドを含むことができる。

10

#### 【0133】

当業者は、プライマー対がSLEVの3' UTR領域からの所望する配列を増幅するために、配列番号29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40を用いて企画され得ることを理解するであろう。いくつかの態様においては、本発明の第1のプライマーは、TTGACACCTG GAAAGACAGGAGA（配列番号68）にハイブリダイズし、そして第2のプライマーは、増幅反応のプライミングを可能にする条件下で、CAAAGCCCCTCATTCCGACTCGGG（配列番号69）の相補体にハイブリダイズする。

SLEVを検出し、そして/又は増幅するための典型的なプライマーは、表4に示されるそれらを包含する。

20

#### 【0134】

#### 【表4】

表4：

配列	説明	配列番号
CAAAGCCCCTCATTCCGACTCGGGA	セントルイス脳炎ウィルス上流プライマー	64
CAAAGCCCCTCATTCCGACTCGGGJ	セントルイス脳炎ウィルス上流プライマー	65
TCTCCTGTCTTTCCAGGTGTCAA	セントルイス脳炎ウィルス下流プライマー	66
TCTCCTGTCTTTCCAGGTGTCAJ	セントルイス脳炎ウィルス下流プライマー	67

30

接尾語は、表2を参照のこと。

#### 【0135】

#### 3.2. 核酸プローブ：

もう1つの観点においては、本発明は一定のフラビウィルスの核酸の検出のためのプローブを提供する。本発明のプローブにより検出され得るフラビウィルス核酸は、下記セクション3.3及び3.4に記載されている。プローブは、当業者に知られている検出できるフラビウィルスの核酸の存在を同定するために使用され得るいずれかの核酸プローブであり得る。典型的には、プローブは、検出されるべきフラビウィルスの核酸における領域にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含んで成る。

40

#### 【0136】

プローブヌクレオチド配列は、検出されるべきフラビウィルスの核酸を特異的に結合するのに十分ないずれかの長さのものであり得る。ある態様においては、プローブは、少なくとも約6個のヌクレオチドを含んで成る。ある態様においては、プローブは約140個よりも少ないヌクレオチドを含んで成る。ある態様においては、プローブは、約18～約25個、約25～約35個、又は約35～約45個の長さのヌクレオチドであり得る。プローブの長さ及び組成は、行われる検出方法に依存する適切な反応条件下でフラビウィルス核酸へのプローブのハイブリダイゼーションを確保するための十分な熱力学的安定性を与えるために選択され得る。

50

## 【 0 1 3 7 】

例えば、修飾された非標準の又は誘導体化されたヌクレオチドを有するプローブは、類似する熱力学的ハイブリダイゼーション性質を有すると共に、従来のヌクレオチドを有するそれらのプローブよりも長い又は短い。そのような非標準の塩基の例は、引用により本明細書に組込まれる、アメリカ特許第6,320,005号、第6,174,998号、第6,001,611号及び第5,990,303号に見出され得る。もう1つの例として、G/Cに富んでいる配列を有するプローブは、A/Tに富んでいる配列を有する類似する長さのプライマーよりも高い温度で標的配列にアニーリングすることができる。

## 【 0 1 3 8 】

典型的には、検出できる核酸にハイブリダイズするプローブヌクレオチド配列の一部は、プローブがハイブリダイズする検出できる核酸の領域に対して同一か又は相補的である。しかしながら、プローブのこの部分は、プローブがハイブリダイズする検出できるウィルス核酸の領域に対して100%以下の配列同一性又は相補性を有することができる。本発明のある態様においては、検出できるウィルス核酸にハイブリダイズするプローブの一部のヌクレオチド配列は、プローブがハイブリダイズする検出できるウィルス核酸の領域に対して、約99%、約98%、約97%、約96%、約95%、約90%、約85% 又は約80%の相補性又は同一性を有することができる。

10

## 【 0 1 3 9 】

ある態様においては、本発明は、配列番号16の核酸にハイブリダイズする核酸を含んで成る、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの検出のためのプローブを提供する。配列番号16は、図3に表わされるように、本発明の組成物及び方法を用いて検出され得るフラビウィルスのゲノムの3' 未翻訳領域における保存された配列の領域を表わす。図3はまた、配列番号17が配列番号16に対する相補体を表わすことを示す。

20

## 【 0 1 4 0 】

本発明のそのような態様においては、プローブは、配列番号16の核酸への定義される条件下でのハイブリダイゼーションを可能にするヌクレオチド組成物、すなわち化学構造体を有する。例えば、配列番号16の核酸におけるC残基にハイブリダイズする標準ヌクレオチドを含むプライマーは、その対応する位置にG残基を有するべきである。従って、配列番号16の核酸へのハイブリダイゼーションは、ヌクレオチド配列、及び従って、プローブの正確な化学構造を定義する。さらに、プローブはまた、上記に引用されるオリゴヌクレオチド及びプライマーの定義に従って非標準のヌクレオチドを含んで成る。

30

## 【 0 1 4 1 】

そのような非標準のヌクレオチドはまた、塩基対を形成するために、他の標準又は非標準のヌクレオチドに結合することができる。例えば、非標準のヌクレオチドイノシンはウラシル、シトシン及びアデニンと対合することができる。例えば、非標準のヌクレオチドは、ウラシル、シトシン及びアデニンと対合することができる。ハイブリダイゼーションと化学構造との間の既知の相互関係が与えられる場合、当業者は本発明のプライマーの標準特徴を容易に認識することができる。典型的な態様が下記に詳細に記載される。

## 【 0 1 4 2 】

ある態様においては、配列番号16にハイブリダイズすることができるプローブは、約10、約12、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約32、約34、約36、約38、約40、約42、約44、約46、約48、約50、約55、約60、約65、約70、約75、又は約80個のヌクレオチドを含んで成る。ある態様においては、プローブは、上記に定義されるように、修飾され、非標準の又は誘導体化された塩基を含んで成る。

40

## 【 0 1 4 3 】

ある態様においては、プローブは、配列番号17の少なくとも約20個の連続ヌクレオチドを含んで成る。他の態様においては、プローブは、配列番号17の少なくとも約22個の連続ヌクレオチドを含んで成る。さらに他のある態様においては、プローブは、配列番号17の少なくとも約24個の連続ヌクレオチドを含んで成る。さらに他の態様においては、プロー

50

ブは、配列番号17の少なくとも約26個の連続ヌクレオチドを含んで成る。さらに他の態様においては、プローブは、配列番号17の少なくとも約28個の連続ヌクレオチドを含んで成る。

【 0 1 4 4 】

さらに他の態様においては、プローブは、配列番号30の少なくとも約28個の連続ヌクレオチドを含んで成る。さらに他の態様においては、プローブは、配列番号17の少なくとも約32個の連続ヌクレオチドを含んで成る。さらに他の態様においては、プローブは、配列番号17の少なくとも約34個の連続ヌクレオチドを含んで成る。さらに他の態様においては、プローブは、配列番号17の少なくとも約36個の連続ヌクレオチドを含んで成る。さらに他の態様においては、プローブは、配列番号17の少なくとも約38個の連続ヌクレオチドを含んで成る。さらに他の態様においては、プローブは、配列番号17の少なくとも約40個の連続ヌクレオチドを含んで成る。

10

【 0 1 4 5 】

ある態様においては、本発明は、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバー、及び一定の他のフラビウイルスを検出するために使用され得る核酸プローブを提供する。それらのプローブは、表5に表わされるように、それらの核酸配列を参照して構造的に定義され得る。

【 0 1 4 6 】

【表 5】

表 5	
配列番号18： フラビウスの検出 のためのプローブ	GGN <sup>3</sup> CTAGN <sup>8</sup> GGTTAGAGGAGACCCN <sup>2,4</sup> N <sup>2,5</sup> N <sup>2,6</sup> N <sup>2,7</sup> N <sup>2,8</sup> ここで、N <sup>3</sup> はA又はTであり；N <sup>8</sup> はA又はTであり；N <sup>2,4</sup> はC又はTであり；N <sup>2,5</sup> はG、C、T、Aであるか、又は不在であり；N <sup>2,6</sup> はC、T、Gであるか、又は不在であり；N <sup>2,7</sup> はG、C、A、Tであるか、又は不在であり；そしてN <sup>2,8</sup> はG、C、A、Tであるか、又は不在である。
配列番号19： 日本脳炎ウイルス血清 グループメンバーの検 出のためのプローブ	GGACTAGN <sup>8</sup> GGTTAGAGGAGACCCN <sup>2,5</sup> N <sup>2,6</sup> N <sup>2,7</sup> N <sup>2,8</sup> ここでN <sup>8</sup> はA又はTであり；N <sup>2,5</sup> はG又はAであり；N <sup>2,6</sup> はC又はTであり；N <sup>2,7</sup> はG又はTであり；そしてN <sup>2,8</sup> はG又はTである。
配列番号20： 西ナイル熱ウイルスの 検出のためのプローブ	GGACTAGN <sup>8</sup> GGTTAGAGGAGACCCN <sup>2,5</sup> CGN <sup>2,8</sup> ここでN <sup>8</sup> はA又はTであり；N <sup>2,5</sup> はG又はAであり；そしてN <sup>2,8</sup> はG又はTである。
配列番号21： 日本脳炎ウイルス血清 グループメンバーの検 出のためのプローブ	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCN <sup>2,6</sup> GG ここでN <sup>2,6</sup> はC又はTである。
配列番号22： マリーバレー脳炎ウィ ルスの検出のためのプ ローブ	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCACTC
配列番号23： クンジンウイルスの検 出のためのプローブ	AATAN <sup>5</sup> GTGGATTACATGAN <sup>1,9</sup> TTCAN <sup>2,4</sup> TGAAG ここでN <sup>5</sup> はT又はCであり；N <sup>1,9</sup> はG又はCであり；そしてN <sup>2,4</sup> はT又はCである。
配列番号24： デング熱ウイルスの検 出のためのプローブ	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCN <sup>2,5</sup> N <sup>2,6</sup> N <sup>2,7</sup> N <sup>2,8</sup> ここでN <sup>2,5</sup> はC又はTであり；N <sup>2,6</sup> はC又はGであり；N <sup>2,7</sup> はC又はGであり；N <sup>2,8</sup> はG、C又はAである。
配列番号25： 黄熱病ウイルスの検出 のためのプローブ	GGTCTAGAGGTTAGAGGAGACCCCTCCAG
配列番号26： モンタナ筋炎白質脳炎 ウイルスの検出のため のプローブ	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCTTCC
配列番号27： モドックウイルスの検 出のためのプローブ	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGGC
配列番号28： 例プライマー 1	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGCGG
配列番号70： フラビウスアンチ センスプローブ	GGGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCTTCCCCC

## 【0147】

本発明のある態様においては、プローブは配列番号18～28又は70、又はそれらの相補体のいずれかを含んで成る。

## 【0148】

本発明の核酸プローブはさらに、開示されるプローブにより検出され得る、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバー又はもう1のフラビウスの核酸から誘導されず、そし

10

20

30

40

50

て/又はそれにハイブリダイズしない他の核酸配列を含んで成ることができる。それらの追加の核酸配列は、プローブに所望する官能性を提供するために当業者により選択され得る。例えば、核酸プローブは、改良された検出方法を可能にする追加の配列を含んで成ることができる。

【0149】

追加の核酸配列を含んで成るか、又は他方では、本発明のプローブ、方法及びキットへの使用のために適合され得るプローブの例は、引用により本明細書に組込まれる、アメリカ特許第6,323,337号、第6,248,526号、第6,150,097号、第6,117,635号、第6,090,552号、第5,866,336号、及び第5,723,591号に見出され得る。さらに、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの又は他の検出できるフラビウィルスの核酸を包含する、核酸の検出方法は、下記セクション4.2及び4.3に集中的に記載されている。それらの方法は、本発明の核酸プライマーに存在することができる追加の核酸配列を使用し；そのような追加の核酸配列、及び日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーを検出するためへのそれらの追加の配列を用いる方法が下記に記載される。

【0150】

本発明の核酸プローブは、当業者に知られているいずれかの方法により調製され得る。特に上記に記載される本発明の核酸プライマーを調整するために使用される方法はまた、本発明の核酸プローブを調製するためにも使用され得る。

【0151】

プローブヌクレオチド配列の他に、プローブは、本発明の方法を阻害しない追加のヌクレオチド配列又は他の成分を含んで成ることができる。本発明の便利な態様においては、プローブは本発明の方法を促進する追加のヌクレオチド配列又は他の成分を含んで成ることができる。例えば、プローブは、プローブによる所望しない核酸重合プライミングを妨げるためにその3'末端で阻止され得る。また、成分は、ヌクレオチド配列によるプローブ又はプローブフラグメントのハイブリダイゼーションを安定化するか又は不安定化するプローブ内に存在することができる。本発明のプローブはまた、上記に定義されるような、修飾され、非標準の又は誘導体化されたヌクレオチドを含んで成ることができる。

【0152】

本発明のある態様においては、プローブは検出できる成分を含んで成る。検出できる成分は、当業者により知られているいずれかの検出できる成分であり得る。さらに、検出できる成分は、当業者に知られているいずれかの手段により検出できる。例えば、検出できる成分は、分光、光化学、生化学、免疫化学又は化学的手段により検出できる。

【0153】

本発明のプローブを検出するために使用され得る種々の検出できる成分、及びプローブへのそれらの結合のための方法は、当業界に知られており、そして酵素（例えば、アルカリホスファターゼ及びホースラディッシュペルオキシダーゼ）及び酵素基質、放射性成分、蛍光成分、発色団、化学ルミネセントラベル、電気化学ルミネセントラベル、例えばOrigin™(Igen)、特異的結合パートナーを有するリガンド、又はシグナルを増強し、変更し、又は低めるためにお互い、相互作用することができるいずれか他のラベルを結合するが、但しそれらだけには限定されない。もちろん、5'ヌクレアーゼ反応が高温で熱安定性DNAポリメラーゼを用いて行われるべきであり、検出できる成分は分解されるべきではなく、又は他方では、そのような高温により検出できなくされるべきではない。

【0154】

ある態様においては、検出できる成分は蛍光成分であり得る。蛍光成分は、当業者に知られているいずれかの蛍光成分であり得る。一般的に、モノクロメーターよりもむしろフィルターとの蛍光計の使用を可能にし、そして検出の効率を高める、広いストークスシフトを有する蛍光成分が好ましい。ある態様においては、蛍光成分は、フルオレセイン-ファミリー色素（Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA）、ポリハロフルオレセイン-ファミリー色素、ヘキサクロフルオレセイン-ファミリー色素、クマリン-フェミリー色素（Molecular Probes, Inc., Eugene, Or）、ローダミン-ファミリー色

素 (Integrated DNA Technologies, Inc.)、シアニン - ファミリー色素、オキサジン - ファミリー色素、チアジン - ファミリー色素、スクアライン - ファミリー色素、キレート化されたランタニド - ファミリー色素、及びBODIPY (商標) - ファミリー色素 (Molecular Probes, Inc.) から成る群から選択され得る。

【0155】

好ましい態様においては、蛍光成分は、6 - カルボキシフルオレセイン (FAM<sup>TM</sup>) (Integrated DNA Technologies, Inc.)である。本発明のプローブ、方法及びキットに使用され得るフルオレセイン成分の他の例は、引用により本明細書に組込まれるアメリカ特許第6, 406, 297号, 第6, 221, 604号, 第5, 994, 063号, 第5, 808, 044号, 第5, 880, 287号, 第5, 556, 959号, 及び 第5, 135, 717号に見出され得る。

10

【0156】

他の態様においては、検出できる成分は、蛍光成分以外の検出できる成分であり得る。放射性成分の中で、<sup>32</sup>P - ラベルされた化合物が好ましい。当業者に知られているいずれかの方法が、<sup>32</sup>Pをプローブに導入するために使用され得る。例えば、プローブは、キナーゼによる5' ラベリングにより、又はニックトランスレーションによるランダム挿入により、<sup>32</sup>Pによりラベルされ得る。酵素である検出できる成分は典型的には、それらの活性により検出され得る。例えば、アルカリホスファターゼは、適切な基質化合物に対する酵素の作用により生成される蛍光を測定することにより検出され得る。特異的結合パートナーのメンバーが検出できる成分として使用される場合、プローブの存在は、特異的結合パートナーのメンバーへの分子の特異的結合を検出することにより検出され得る。例えば、抗原はプローブに結合され、そしてその抗原に対して特異的なモノクローナル抗体は、抗原及び従って、プローブの存在を検出するために使用され得る。

20

【0157】

検出できる成分として使用され得る他の特異的結合パートナーは、ビオチン及びアビジン、又はストレプトアビジン、IgG及びプロテインA、及び当業界において良く知られている多くの他の受容体 - リガンド結合を包含する。蛍光成分でない検出できる成分のさらなる他の例は、引用により本明細書に組込まれる、アメリカ特許第5, 525, 465号, 第5, 464, 746号, 第5, 424, 414号, 及び 第4, 948, 882号に見出され得る。

【0158】

検出できる成分の上記の記載は、同じラベルがいくつかの異なった態様で作用することができるので、種々のラベルを明確なクラスに分類することを意味しない。例えば、<sup>125</sup>Iは、放射性成分として又は電子密な試薬として作用することができる。ホースラディッシュペルオキシダーゼは、モノクローナル抗体のための酵素として又は抗原として作用することができる。さらに、所望する効果のために種々の検出できる成分を組合すことができる。例えば、プローブをビオチンによりラベルし、そして<sup>125</sup>Iによりラベルされたアビジン、又はホースラディッシュペルオキシダーゼによりラベルされた抗 - ビオチンモノクローナル抗体によりその存在を検出することができる。他の置換及び可能性は、当業界に容易に明らかに成り、そして本発明の範囲内で同等物として見なされる。

30

【0159】

もちろん、プローブへの検出できる成分の結合又は接合方法は、使用される検出できる成分の型、及びプローブ上の検出できる成分の位置に依存する。

40

【0160】

検出できる成分は、種々の技法により、プローブに直接的に又は間接的に結合され得る。使用される検出できる成分の正確な型に依存して、検出できる成分は、プローブの5'又は3'末端に位置し、プローブのヌクレオチド配列の内部的に位置するか、又はシグナル相互作用を促進するために、種々のサイズのスペーサーアーム及び組成物に結合され得る。市販のホスホラミジット試薬を用いて、適切に生成されたホスホラミジットを通していずれかの末端で、官能基 (例えば、チオール又は第一アミン) を含むオリゴヌクレオチドを生成することができ、そして例えばPCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. by Innis et al., Academic Press, Inc., 1990に記載されるプロトコル

50



ルを用いて、検出できる成分をそれに結合することができる。

【0161】

典型的には5'末端で、オリゴヌクレオチドプローブ配列中に1又は複数のスルフヒドリル、アミノ又はヒドロキシル成分を導入するためにオリゴヌクレオチド官能化試薬を導入するための方法は、アメリカ特許第4,914,210号に記載されている。5'ホスフェート基は、レポーター基を供給するために、ポリヌクレオチドキナーゼ及び[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATPを用いることにより放射性同位体として導入され得る。ビオチンは、合成の間、導入されるアミノチミジン残基又はアルキルアミノリンカーと、ビオチンのN-ヒドロキシスクシンイミドエステルとの反応により、その5'末端に付加され得る。検出できる成分、例えば蛍光成分をプローブに結合するための他の方法は、引用により本明細書に組み込まれるアメリカ特許第5,118,802号に見出され得る。

10

【0162】

所望する成分、例えばコルジセピン $^{35}\text{S}$ -dATP及びビオチニル化されたdUTPを付加するために、例えばポリヌクレオチド末端トランスフェラーゼを用いることにより、プローブの3'末端で検出できる成分を結合することもまた可能である。

オリゴヌクレオチド誘導体はまた、本発明のプローブ、方法及びキットに使用され得る検出できる成分である。例えば、エテノ-dA及びエテノ-dCは、プローブ合成に使用されるもう1つの類似体である。そのようなヌクレオチド誘導体を含むプローブは、例えばポリメラーゼ5'→3'ヌクレアーゼ活性により、損なわれていないプローブよりも一層強い蛍光であるモノヌクレオチドを開放するために分解され得る。

20

【0163】

本発明のある態様においては、プローブは、1つよりも多くの検出できる成分によりラベルされ得る。そのような態様においては、個々の検出できる成分は、プローブの異なった塩基に個々に結合され得る。他の態様においては、1つよりも多くの検出できる成分がプローブの同じ塩基に結合され得る。

【0164】

ある態様においては、検出できる成分は、プローブの5'末端に結合され得る。他の態様においては、検出できる成分は、プローブの5'末端から1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 約35, 又は約40個の残基以内に存在する残基でプローブに結合され得る。ある態様においては、検出できる成分は、プローブの3'末端に結合され得る。他の態様においては、検出できる成分は、プローブの3'末端から1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 約35, 又は約40個の残基以内に存在する残基でプローブに結合され得る。検出できる成分は、プローブの残基のいずれかの部分に結合され得る。例えば、検出できる成分は、プローブにおけるヌクレオチドの糖、ホスフェート又は塩基成分に結合され得る。他の態様においては、検出できる成分は、プローブの2種の残基間に結合され得る。

30

【0165】

本発明のある態様においては、プローブは蛍光成分及び消光剤成分を含んで成ることができる。そのような態様においては、蛍光成分は、上記に記載のような、当業者に知られているいずれかの蛍光成分であり得る。さらに、消光剤成分は、制限なしに当業者に知られているいずれかの消光剤成分であり得る。ある態様においては、消光剤成分は、フルオレセイン-ファミリー色素、ポリハロフルオレセイン-ファミリー色素、ヘキサクロロフルオレセイン-ファミリー色素、ローダミン-ファミリー色素、シアニン-ファミリー色素、オキサジン-ファミリー色素、チアジン-ファミリー色素、スクアライン-ファミリー色素、キレート化されたランタニド-ファミリー色素、BODIPY(商標)-ファミリー色素、及び非蛍光消光剤成分から成る群から選択され得る。

40

【0166】

ある態様においては、前記非蛍光消光剤成分は、BHO<sup>TM</sup>-ファミリー色素(W001/86001号に記載される消光剤を包含する)、Iowa Block<sup>TM</sup>又はDabcyl(Integrated DNA Technol

50

ogies, Inc.) であり得る。特定の消光剤成分の他の例は、例えば次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：TAMRA(N, N, N', N'- テトラメチル-6-カルボキシローダミン) (Molecular Probes, Inc.), DABCYL (4-(4' -ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸), Iowa BUack (Integrated IDNA Technologies, Inc. ), Cy3 (Integrated DNA Technologies, Inc.) 又は Cy5 (Integrated DNA Technologies, Inc. )。好ましい態様においては、消光剤成分は、Cy5<sup>TM</sup>である。本発明のプロープ、方法及びキットに使用され得る消光剤成分の他の例は、引用により本明細書に組み込まれるアメリカ特許第6,399, 392号, 第6, 348,596号, 第6,080, 068号, 及び 第5,707,813号に見出され得る。

【0167】

ある態様においては、消光剤成分は、プロープの3'末端に結合され得る。他の態様においては、消光剤成分は、プロープの5'末端から1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 約35, 又は約40個の残基である残基でプロープに結合される。ある態様においては、消光剤成分は、プロープの3'末端に結合され得る。

【0168】

他の態様においては、プロープの3'末端から1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 約35, 又は約40個の残基である残基でプロープに結合される。好ましい態様においては、蛍光成分は、プロープの5'末端に結合され、そして消光剤成分はプロープの5'末端の約9個の残基内に存在する残基に結合される。消光剤成分は、プロープの残基のいずれかの部分に結合される。例えば、消光剤成分は、プロープにおけるヌクレオチドの糖、ホスフェート又は塩基成分に結合され得る。他の態様においては、消光剤成分は、プロープの2種の残基間に結合され得る。

【0169】

作用のいずれか特定の理論又は機構に結びつけられないが、プロープが損なわれていない場合、蛍光成分により放される光子が吸収され、そして従って消光剤成分により消光され得る。次に、消光剤成分が異なった波長の光子として、又は熱として、光子のエネルギーを放す。従って、消光剤成分はまた、蛍光成分でもあり得る。上記のように、この現象は、蛍光共鳴エネルギー移行(“FRET”)と呼ばれる。蛍光成分と消光剤との間のプロープの切断は、消光剤成分による、蛍光成分の放される蛍光の消光の低下をもたらす。

【0170】

一般的に、蛍光成分と消光剤成分との間のエネルギーの移行は、蛍光成分と消光剤成分との間の距離、及び特定の蛍光成分 - 消光剤成分対の決定的移行距離に依存する。前記決定的移行距離は、所定の消光剤成分により対合される所定の蛍光成分に関して、特徴的であり、且つ一定である。さらに、消光剤に対する蛍光成分の空間的關係は、蛍光成分 - 消光剤成分対の決定的移行距離が蛍光成分と消光成分との間の距離に近い場合、より敏感に決定され得る。従って、当業者は、プロープ上の消光剤成分から蛍光成分を分離する距離に近い決定的移行距離を有する、蛍光成分及び消光剤成分を選択することができる。特定の蛍光成分 - 消光剤成分対の決定的移行距離は、当業界において良く知られており、そして引用により本明細書に組み込まれる、Wu and Brand, 1994, Anal. Biochem. 218: 1-13 による文献に見出され得る。

【0171】

特定の蛍光成分 - 消光剤成分対のセクションについての他の基準は、蛍光成分による蛍光放出の収量；蛍光成分により放される蛍光の波長；消光剤成分の消衰係数；消光剤成分により放される蛍光の波長；及び消光剤成分による蛍光放出の収量を包含する。さらに、消光剤成分がま、蛍光成分である場合、消光剤成分及び蛍光成分は好ましくは、1つの成分により放される蛍光の他の成分から放される蛍光から容易に区別され得るよう選択され得る。特定の蛍光成分 - 消光剤成分対の選択に対するさらなるガイドは、引用により本明細書に組み込まれるKlostermeier and Millar, 2002, Biopolymers 61: 159-179による再考文献に見出され得る。

## 【 0 1 7 2 】

本発明のこの観点に使用され得る、蛍光成分及び消光剤成分の典型的な組合せは、蛍光成分ローダミン590及び消光剤成分クリスタルバイオレットを包含するが、但しそれらだけには限定されない。蛍光及び消光剤成分の好ましい組合せは、蛍光成分6 - カルボキシフルオレsein及び消光剤成分Cy5<sup>TM</sup>である。本発明のプロープ、方法及びキットに使用され得る蛍光成分 - 消光剤成分対の他の例は、引用により本明細書に組み込まれるアメリカ特許第6,245,514号に見出され得る。

## 【 0 1 7 3 】

FRETにおいて蛍光又は消光剤成分の両者として使用され得る分子の例は、フルオレsein、6 - カルボキシフルオレsein、2'7' - ジメトキシ - 4'5' - ジクロロ - 6 - カルボキシフルオレsein、ローダミン、6 - カルボキシローダミン、6 - カルボキシ - X - ローダミン及び5 - (2' - アミノエチル) アミノナフタレン - 1 - スルホン酸 (EDANS) を包含する。蛍光成分がドナー又は受容体であろうと、なかろうと、その励起及び発光スペクトル、及びそれが対合される蛍光成分により定義される。例えば、FAM<sup>TM</sup>は、488nmの波長を有する光により、最も効果的に励起され、そして500 ~ 650nmのスペクトルを有する光を放し、そして525nmの最大発光を有する。従って、FAM<sup>TM</sup>は、その励起で最大514nmを有する消光剤成分としてTAMRAと共に使用するための適切な蛍光成分である。

## 【 0 1 7 4 】

いくつかの態様においては、次のプロープ変異体が使用される：

FGGACTAGAI GGTTAGAGGAGACCCCGCGGP (配列番号28の変異体である)；

FGGAEUAGAI GGUAGAGGAGAE EEEEGEGGP (配列番号28の変異体である)；

FGGGTCTCCITCTAACCTCTAGTCCTTCCCCCP (配列番号70の変異体である)；

FGGGUEUEE IUEUAACCTCTAGTCCTTCCCCCP (配列番号70の変異体である)；及び

FGGTCTAGAI GGTTAGAGGAGACCTCCAGP (配列番号25の変異体である)。

上記プロープのすべてにおいては、次の通りである：F = CY5；I = FAM；P = PO4；U = プロピニルdU；E = 5 - メチル - dC。

## 【 0 1 7 5 】

3.3. 日本脳炎ウイルス血清グループの検出できるメンバーの核酸；

本発明のプライマー、プロープ、方法及びキットは、フラビウイルス属の一定のメンバーの検出のために有用である。特に、前記プライマー、プロープ、方法及びキットは、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーを検出するために有用である。例えば；本明細書に従って検出され得る日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーは、日本脳炎ウイルス、西ナイル熱ウイルス、マリーバレー脳炎ウイルス、SLEV及びクンジウィルスを包含するが、但しそれらだけには限定されない。いくつかの場合、いくつかのそれらのウィルスの少なくとも1つの株の完全な配列は、決定されている。それらの配列は、日本脳炎ウイルス血清グループメンバーの核酸配列と本発明のヌクレオチドとの一列整列を提供する、図4に表わされるGenBank受託番号への参照により見出され得る。

## 【 0 1 7 6 】

図4における受託番号により同定される個々のウィルス血清グループのほかのメンバー、例えばCacipacoreウィルス、セントルイス脳炎ウィルス、Usutuウィルス及びYouendeウィルスのゲノムの完全な核酸配列はまだ決定されていない。それにもかかわらず、本発明のプライマー及びプロープは、日本脳炎ウイルス血清グループのすべてのメンバーと高い程度の保存性を有する配列にハイブリダイズすると思われる。さらに、当業者は、そのプライマー及びプロープが、それらのウィルスゲノムの核酸配列の決定に続いて、まだ配列決定されていないメンバーの1つからの核酸にハイブリダイズできることを容易に理解することができる。

## 【 0 1 7 7 】

ある態様においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸が検出され得る。他の態様においては、日本脳炎ウイルスの核酸が検出され得る。さらに他の態様においては、ウィルスナイル熱ウイルスの核酸が検出され得る。さらに他の態様においては、ク

10

20

30

40

50

ンジウィルスの核酸が検出され得る。さらに他の態様においては、マリーバレー脳炎ウィルスの核酸が検出され得る。さらに他の態様においては、SLEVの核酸が検出され得る。さらに他の態様においては、日本脳炎ウィルス、西ナイル熱ウィルス、SLEV又はマリーバレー脳炎ウィルスの核酸が検出され得る。

【0178】

検出されるべき核酸は、本明細書に記載されるような検出できるフラビウィルスからのいずれかの核酸であり得る。典型的には、核酸は、検出されるべきフラビウィルスは+鎖の一本鎖RNAゲノムを有するので、一本鎖RNAであろう。しかしながら、検出されるべき核酸はまた、検出され得るフラビウィルスのRNAゲノムの配列において対応するDNAでもあり得る。そのようなDNAは、例えば下記セクション4.1.に記載されるように、ウィルスRNAを逆転写することにより調製され得る。

10

【0179】

検出できるフラビウィルスの核酸の存在は、当業者に知られているいずれかの源からのサンプルにおいて検出され得る。例えば、ウィルス核酸は、上記に定義されるように、生物学的サンプルにおいて検出され得る。ウィルス核酸は、いずれかの天然源、例えば脊椎動物、例えば魚、両性類、爬虫類、鳥、又は哺乳類、及び無脊椎動物、例えば昆虫、甲殻類、クモ類、等からのサンプルにおいて検出され得る。さらに、試験されるべきサンプルは、非生存源、例えば水又は土壌サンプル、又はスワイプサンプル、例えば表面を試験することに起因するサンプルからであり得る。

20

【0180】

本発明のある態様においては、検出されるべき核酸は、当業者に知られている方法に従って増幅され得る。増幅は、本明細書に記載される方法に従って、検出の前に行われるか、又は増幅は本明細書に記載されるように検出と同時に行われ得る。核酸を増幅するための方法は、下記に、及び例えば引用により本明細書に組込まれるSaiki など., 1988, Science 239: 487-91に記載される。

【0181】

3.4. 他の検出できるフラビウィルスの核酸：

本発明のプロープ、方法及びキットはまた、他のフラビウィルス、例えばデング熱ウィルス、モンタナ筋炎白質脳炎ウィルス、モドックウィルス及び黄熱病ウィルス（但し、それらだけに限定されない）からの核酸を検出するためにも使用され得る。日本脳炎ウィルスは、それらの検出できるフラビウィルスの核酸配列と配列番号16との一列整列を提供する、図5に表わされる受託番号への参照により見出され得る。図5におけるGenBank受託番号により同定される個々のフラビウィルスゲノムの核酸配列は、引用により本明細書に組込まれる。

30

【0182】

本明細書において論じられるように、プライマー41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54及び55は、デング熱ウィルスの増幅及び/又は検出のために有用であり、そしてプライマー56, 57, 58, 59, 60, 61, 62及び63は、黄熱病ウィルスの増幅及び/又は検出のために有用である。

40

【0183】

3.5. 異なったウィルス変異体又は異なったウィルスを検出するための多重増幅反応：

本発明のプライマー及びプロープは、1つよりも多くのウィルス核酸を検出するために反応において組み合わせられ得る。例えば、いくつかの場合、多数の上流及び/又は多数の下流プライマーは、異なったウィルス変異体（例えば、検出されず、又は単一のプライマー又はプライマー対により不良に検出される）の検出への使用のために1つの反応混合物において組み合わせられる。いくつかの態様においては、多数の上流及び/又は多数の下流プライマーは、1つよりも多くのウィルスを検出するために1つの反応混合物において組み合わせられる。

【0184】

そのような態様においては、検出されるべき個々のウィルスに対して特異的プライマー

50

は、反応混合物に包含され、それにより、サンプルに存在する個々のウィルス核酸の増幅を可能にする。例えば、西ナイル熱ウィルス、SLEV、デング熱ウィルス及び黄熱病ウィルスの増幅のためのプライマーのいずれかの組合せが、どのウィルスの検出が所望されるかに依存して包含され得る。単一の反応を用いての多数のウィルスの検出は、例えば血液供給物をスクリーニングする場合、又はいずれかのウィルスによる汚染が検出される必要があるすべてである他の場合において有用である。

【0185】

本発明のプロープは、上記反応に使用され得る。所望する結果に依存して、いずれかの可能なウィルス核酸生成物を検出できる単一のプロープが使用され得る。他方では、個々の可能なウィルス核酸生成物に特異的にハイブリダイズする異なったプロープが使用され得る。そのような場合、個々のプロープと共に異なった検出できるラベルを用いることが有用であり、それにより、ウィルス核酸生成物の分化を可能にする。

【0186】

いくつかの態様においては、多重PCRが、上記成分を用いて、多数のウィルス核酸を検出するために使用され得る。多重PCRは、同じ反応における多数のポリヌクレオチドフラグメントの増幅及び/又は検出を可能にする。例えば、PCR PRIMER, A LABORATORY MANUAL (Dieffenbach, ed. 1995) Cold Spring Harbor Press, pages 157-171を参照のこと。

いくつかの場合、西ナイル熱ウィルス及びSLEVの両者の検出のためのプライマーが使用される。いくつかの態様においては、西ナイル熱ウィルス、SLEV及びデング熱ウィルスの検出のためのプライマーが使用される。いくつかの態様においては、西ナイル熱ウィルス、SLEV及び黄熱病ウィルスの検出のためのプライマーが使用される。いくつかの態様のい

【0187】

4. 日本脳炎ウィルス血清グループのメンバー及び確かな他のフラビウィルスの核酸の検出及び/又は定量化方法：

ある観点においては、本発明は、一定のフラビウィルスの核酸を検出するための核酸プライマー及びプロープの使用法を提供する。他の観点においては、本発明は、サンプルにおける一定のフラビウィルスの核酸を増幅するためへの核酸プライマー及びプロープの使用法を提供する。当業者において知られている核酸を検出するために核酸プライマー及びプロープを用いるためのいずれかの方法が、上記のように、検出できるフラビウィルスの核酸を検出するために使用され得る。

【0188】

ある態様においては、前記方法は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を検出するためへのプライマー及びプロープの使用を提供する。他の態様においては、前記方法は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を検出するためへの2種のプライマー及びプロープの使用を提供する。さらに他の態様においては、前記方法は、下記のような一定のフラビウィルスを検出するためへのプロープの使用を提供する。

【0189】

4.1. 日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を検出し、そして/又は定量化するための5'ヌクレアーゼ反応に基づくアッセイ：

本発明のある観点においては、前記方法は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を、プライマー及びプロープにより検出することを含んで成る。それらの方法は一般的に、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸にハイブリダイズされるプライマーと、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素とを接触することを含んで成る。次に、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素は、5'ヌクレアーゼ反応において日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸にハイブリダイズされるプロープを断片化する。プロープは、そのプロープの断片化の検出を可能にする検出できる成分によりラベルされ得る。そのような方法は、引用により本明細書に組込まれるアメリカ特許第6,214,979号、第5,804,375

号, 第5,487, 972号及び 第5,210, 015号に記載されているそれらの方法に基づかれています。

【0190】

5'ヌクレアーゼ反応においては、核酸、プライマー及びプローブが、5' 3'ヌクレアーゼ活性を有することが当業者により知られているいずれかの酵素と接触せしめられる。ポリメラーゼによるプローブの切断及び核酸からのプローブの多くのフラグメントの開放を可能にする条件が好ましくは、選択される。5'ヌクレアーゼ活性を有する好ましい酵素は、鋳型-依存性核酸ポリメラーゼを包含する。既知の天然の及び組換え形のそのようなポリメラーゼは、例えばE. コリDNAポリメラーゼI (Fermentas, Inc., Hanover, MD)、バチルス・ステアロサーモフィラス (Bacillus stearothermophilus) DNAポリメラーゼ、及びサーモコカス・リトラリス (Thermococcus littoralis) DNAポリメラーゼを包含する。

10

【0191】

好ましい態様においては、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素は、熱安定性で且つ熱活性の核酸ポリメラーゼである。そのような熱安定性ポリメラーゼは、ユーバクテリウム属サーマス (Thermus)、サーマトガ (Thermatoga) 及びサーモシフォ (Thermosipho) の種々の種からの天然の及び組換え形のポリメラーゼを包含するが、但しそれらだけには限定されない。例えば、本発明の方法に使用され得るサーマス種のポリメラーゼは、引用により本明細書に組み込まれる、アメリカ特許第5,405, 774号, 第5, 352,600号, 第5,079, 352号, 第4, 889,818号, 第5,466,591号, 第5,618, 711号, 第5, 674,738号, 及び 第5,795, 762号に記載されるような、サーマス・アクアチカス (Taq) DNAポリメラーゼ、サーマス・サーモフィラス (Tth) DNAポリメラーゼ、サーマス種Z05 (Z05) DNAポリメラーゼ、及びサーマス種sps17 (sps17) を包含する。

20

【0192】

本発明の方法に使用され得るサーマトガポリメラーゼは、例えばサーマト・マリチマDNAポリメラーゼオ及びサーマトガ、ネアポリタナDNAポリメラーゼを包含し、そして使用されるサーモシフォポリメラーゼは、サーモシフォ・アフリカナスDNAポリメラーゼである。サーマトガ・マリチマ及びサーモシフォ・アフリカナスDNAポリメラーゼの配列は、引用により本明細書に組み込まれる、公開番号W092/06200号を有する国際特許出願番号PCT/US91/07035号に公開されている。サーマトガ・ネアポリタナの配列は、引用により本明細書に組み込まれる国債特許番号W097/09451号に見出され得る。

30

【0193】

5'ヌクレアーゼ反応は、検出されるべき核酸と、プライマー、プローブ及び5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する酵素とを、プライマー及びプローブが核酸にハイブリダイズする条件下で接触することを含んで成る。5'ヌクレアーゼ反応の成分はいずれかの順序で検出されるべき核酸を接触することができ、例えばプライマーは、最初に検出されるべき核酸、続いてプローブ、及び5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素を接触することができ、又は他方では、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素は、最初に検出されるべき核酸、続いてプローブ及びプライマーを接触することができる。

【0194】

40

ある態様においては、1つよりも多くのプライマー又はプローブが、5'ヌクレアーゼ反応に添加され得る。確かな好ましい態様においては、1対のプライマーは、5'ヌクレアーゼ反応において核酸を接触することができる。プライマーは、DNA合成反応をプライミングできるいずれかのプライマーであり得る。わずか1つのプライマーが使用される場合、そのプライマーは、プローブの上流の核酸にハイブリダイズすべきであり、すなわちプライマーの3'末端はプローブの5'末端側に向けるべきである。プライマーの3'末端は、プローブの5'末端近くにハイブリダイズし、又はプライマーの3'末端はさらに、プローブの5'末端の上流にハイブリダイズすることができる。1つよりも多くのプライマーが使用される場合、少なくとも1つのプライマーが、上記に記載されるように、プローブの上流の検出されるべき核酸にハイブリダイズするべきである。

50

## 【0195】

本発明の5'ヌクレアーゼ反応のある態様は、当業者に知られているいくつかの5'ヌクレアーゼ反応に基づかされている。そのような反応の例は、引用により本明細書に組み込まれるアメリカ特許第5,210,015号に詳細に記載されている。

## 【0196】

手短に言及すれば、5'ヌクレオチド反応において、標的核酸が、プライマー及びプローブと、そのプライマー及びプローブが核酸の鎖にハイブリダイズする条件下で接触せしめられる。核酸、プライマー及びプローブはまた、5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する酵素、例えば核酸ポリメラーゼと接触される。5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する核酸ポリメラーゼは、プライマーの下流の核酸にハイブリダイズされるプローブを分解することができる。プライマーの3'末端は、鋳型核酸に基づかれるような新規核酸の核酸ポリメラーゼによる延長のための基質を提供する。ポリメラーゼは新規核酸を延長するので、それは、プローブの5'末端に遭遇し、そしてプローブからのフラグメントの切断を開始する。

10

## 【0197】

プライマー及びプローブは、それらが、プライマーの3'末端への核酸ポリメラーゼの結合がプローブの5'末端と接触するよう、お互い密接して標的核酸にハイブリダイズするよう企画され得る。この工程においては、核酸延長は、切断を達成するための位置に核酸ポリメラーゼを導くことを必要とされない。用語“重合-無関係切断”が、この工程を意味する。

20

## 【0198】

他方では、プライマー及びプローブが核酸のより離れた領域にアニーリングする場合、核酸延長は、核酸ポリメラーゼがプローブの5'末端に遭遇する前に起こるべきである。重合が継続するにつれて、ポリメラーゼは、プローブの5'末端からフラグメントを前進的に切断する。この切断は、プローブの残りが、それが鋳型分子から解離する程度まで不安定化されるまで、継続する。用語“重合-依存性切断”が、この工程を意味する。

## 【0199】

重合-無関係の切断の1つの利点は、核酸の増幅の必要性の排除である。プライマー延長の不在下で、核酸の鎖は、実質的に一本鎖である。プライマー及びプローブが核酸に隣接して結合される場合、連続的段階のオリゴヌクレオチドアニーリング及びフラグメントの切断が生じる。従って、十分な量のプローブが、検出できるシグナルを生成するために断片化され、それにより、重合の不在下での検出を可能にする。

30

## 【0200】

いずれの工程においても、核酸を含むサンプルが供給される。核酸が二本鎖化される場合、それは最初に、変性され、例えば核酸の鎖がお互い分離されるべきである。いずれか適切な変性方法、例えば当業者に知られている物理的、化学的又は酵素学的手段が、核酸鎖を分離するために使用され得る。鎖分離のための好ましい物理的手段は、核酸が完全に(99%以上)、変性されるまで、それを加熱することである。典型的な熱変性は、約10秒~約10分間、約80~約105の範囲の温度を包含する。変性の他の手段として、核酸はサンプル、例えば一本鎖RNA又はDNAウィルスにおいて一本鎖形で存在することができる。

40

## 【0201】

本発明のプライマー、プローブ、方法及びキットにより検出され得るウィルスは、一本鎖化された+/-鎖RNAウィルスであることが注目されるべきである。従って、天然のウィルスゲノムの変性は、増幅されていないウィルスゲノムを検出するためには必要とされない。しかしながら、天然のウィルスゲノムが下記に記載される本発明の一定の態様に従ってDNA中に逆転写される場合、増幅されたウィルス核酸の変性は、本発明のプライマー及びプローブによる検出の前、必要である。

## 【0202】

検出されるべき核酸がRNAである場合、そのRNAは上記に記載されるように5'ヌクレアーゼ反応のためのRNA鋳型として使用されるか、又はそのRNAはcDNA中への逆転写のための

50

鋳型として使用されるか、又は両者が同時に行われる。ある態様においては、RNAは、DNAへの逆転写を伴わないで、本発明の方法を用いて検出され得る。上記のような重合 - 無関係の切断がそのような態様のために特に十分に適切である。他の態様においては、RNAは最初に、プローブの不在下でcDNA中に逆転写され、そして次に、cDNA生成物は本発明の方法に従って検出され得る。さらに他の態様においては、RNAは、プローブの存在下で逆転写され、同時に、続いて増幅され、そして/又は検出され得るcDNAが生成され、そして本明細書に記載されるようにしてプローブの断片化を評価することにより、RNAの存在下で検出される。

#### 【0203】

RNAがプローブの不在下で逆転写される場合、RNAは当業者に知られているいずれかの方法によりcDNA中に逆転写され得る。そのような逆転写の生成物は、本明細書に記載される方法に従って、いずれかの検出できる核酸として検出され得る。

10

#### 【0204】

RNAがプローブの存在下で逆転写される場合、RNAは、DNA鎖合成のための鋳型としてRNAを使用することができる、5' 3' ヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼにより逆転写され得る。すべての既知DNAポリメラーゼ合成活性に関しては、そのような合成はプライマー、例えば本明細書に記載されるそれらの存在を必要とする。鋳型としてRNAを使用できるDNAポリメラーゼは好ましくは、熱安定性であり、その結果、変性及びDNA合成の複数のサイクルがポリメラーゼを破壊しないで起こることができる。さらに、逆転写のために使用されるDNAポリメラーゼは好ましくは、DNA鋳型を用いてDNAを合成することがで

20

#### 【0205】

そのようなポリメラーゼは、例えばアメリカ特許第6,468,775号（カルボキシドサーマス・ヒドロゲンホルマンズ（*Carboxydotherrus hydrogenformans*）DNAポリメラーゼ）、第5,968,799号（サーモシフォ・アフリカナス（*Thermosipho africanus*）DNAポリメラーゼ）、第5,736,373号（パチルス・パアリダス（*Bacillus pallidus*）DNAポリメラーゼ）、第5,674,738号（サーマス種Z05 DNAポリメラーゼ）及び第5,407,800号（サーマス・アクアチカス（*Thermus aquaticus*）及びサーマス・サーモフィラス（*Thermus thermophilus*）DNAポリメラーゼ）（それらは引用により本明細書に組み込まれる）に記載されている。さらに、逆転写活性を有する熱安定性DNAポリメラーゼを用いてRNAを逆転写するための方法及び組成物は、引用により本明細書に組込まれる、アメリカ特許第5,693,517号、第5,561,058号、第5,405,774号、第5,352,600号、第5,310,652号、及び第5,079,352号に記載されている。

30

#### 【0206】

RNA又はDNAのいずれかにせよ、変性された核酸鎖は、核酸鎖へのプライマー及びプローブの結合を可能にするハイブリダイゼーション条件下でプライマー及びプローブにより接触される。ある態様においては、2種のプライマーは、核酸を増幅するために使用され得る。その態様においては、2種のプライマーが選択され得、その結果、核酸に沿ってのそれらの相対的位置は、延長生成物とその鋳型（相補体から）から分離された後、1つのプライマーから合成される延長生成物が定義される長さの増幅された生成物を生成するために、他のプライマーの延長のための鋳型として作用することができるような位置である。生成物の長さは、2種のプライマー間の配列の長さ、及び2種のプライマー自体の長さに依存する。

40

#### 【0207】

相補的鎖は典型的には、プローブ又はプライマーのいずれかよりも長いので、鎖はより多くの接触点を有し、そして従って、所定の時間で、より発見の機会及びお互いの結合の機会が存在する。高いモル過剰のプローブ及びプライマーは、鋳型再アニーリングよりもむしろプライマー及びプローブアニーリングに対する平衡シフトを助ける。

#### 【0208】

プライマーは、重合のための剤の存在下で延長生成物の合成を強めるために十分に長く

50



あるべきである。プライマーの正確な長さ及び組成は、多くの因子、例えばアニーリングの温度、プライマーの源及び組成、プライマー・アニーリング部位へのプローブ・アニーリング部位の接近性、及びプライマー：プローブの濃度比に依存する。例えば、配列の複雑性に依存して、オリゴヌクレオチド・プライマーは典型的には約15～30個のヌクレオチドを含むが、但しそれはより少ないか又はより多いヌクレオチドを含むことができる。プライマーは、それらのそれぞれの鎖に選択的にアニーリングし、そして安定した重複体を形成するために十分に相補的であるべきである。

#### 【0209】

個々のプライマーは、核酸の鎖に対して“実質的に”相補的であるよう選択され得る。プライマーは、鋳型の正確な配列に影響を及ぼす必要はないが、しかし適切な反応条件下でそれらのそれぞれの鎖に選択的にハイブリダイズするのに十分に相補的であるべきである。相補的塩基又はより長い配列は、プライマー中に散在され得ないか、又はプライマーの末端に位置され得ないが、但しプライマーはそれらと安定した重複体を形成するためにその鋳型鎖との十分な相補性を保持すべきである。プライマーの非相補的ヌクレオチド配列は、制限の酵素部位を含むことができる。非相補的ヌクレオチド配列は好ましくは、プライマーの3'末端で存在しない。

#### 【0210】

プローブは好ましくは、ポリメラーゼが核酸及びプライマーを結合し、そして検出できる核酸の鋳型に基づいてプライマーからの新規核酸鎖を延長し始める前、検出されるべき核酸にハイブリダイズする。プローブが検出できる核酸と接触する前、ポリメラーゼがプライマー及び検出されるべき核酸を結合することが可能であるが；しかしながら、この配置は下記に記載されるように、好ましいPCRに基づく5'ヌクレアーゼ反応におけるように、プライマー延長の多数のサイクルが行われない場合、低められたプローブ断片化をもたらすことができる。従ってプローブは、ポリメラーゼによるプライマー延長が開始する前、検出されるべき核酸にハイブリダイズすることが好ましい。

#### 【0211】

当業者に知られている種々の技法が、プローブが、プライマー延長重合がこの重複体領域に達する前、又はポリメラーゼが重合・無関係工程における上流のオリゴヌクレオチドに達する前、検出できる核酸にハイブリダイズするであろう蛍光を増強するために使用され得る。例えば、短いプライマー分子は一般的に、核酸との十分に安定したハイブリッド複合体を形成するために、より低い温度を必要とする。従って、プローブはプライマーよりも長く企画され得、その結果、プローブはプライマー・アニーリングに関して高い温度で核酸に選択的にアニーリングする。

#### 【0212】

それらのヌクレオチド組成に基づいて、異なった熱安定性を有するプライマー及びプローブをまた使用することができる。例えば、プローブは、より高いG/C含有率、及び従って、プライマーよりも高い熱安定性を有するよう選択され得る。他方では、又はさらに、1又は複数の修復された、非標準の又は誘導体化されたDNA塩基が、従来のDNA塩基のみを有するプライマー又はプローブに比較して、より高いか又は低い熱安定性をもたらすためにプライマー又はプローブ中に組込まれ得る。そのような修飾された、非標準の又は誘導体化された塩基の例は、引用により本明細書に組み込まれる、アメリカ特許第6,320,005号、第6,174,998号、第6,001,611号、及び第5,990,303号に見出され得る。

#### 【0213】

さらに、反応の温度はまた、プローブ及びプライマーの異なった熱安定性を利用するために変更され得る。例えば、上記のように高い温度での変性に続いて、反応は、プライマーではなく、プローブの結合を可能にする中間温度でインキュベートされ得、続いてさらに、プライマーのアニーリング及び続く延長を可能にするために温度が低められる。

高モル過剰のプライマーに対するプローブの温度がまた、プライマーの前、プローブの結合を選択的に好むよう選択され得る。そのようなプローブ濃度は典型的には、一般的に $0.5 - 5 \times 10^{-7} \text{M}$ である、それぞれのプライマー濃度よりも約2～20倍高い範囲で存在する

10

20

30

40

50

。

## 【0214】

オリゴヌクレオチドプライマーの鋳型 - 依存性延長は、適切な塩、金属カチオン及びpH緩衝システムから成る反応媒体において、上記に論じられるように、適切な量の4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dATP, dGTP, dCTP及びdTTP) 又は類似体、例えばdUTPの存在下でDNAポリメラーゼにより触媒される。適切な重合剤は、プライマー及び鋳型 - 依存性DNA合成を触媒し、そして5' - 3'ヌクレアーゼ活性を有することが知られている酵素である。

## 【0215】

そのような酵素は、例えばE. コリDNAポリメラーゼI、サーマス・サーモフィラスDNAポリメラーゼ、バチルス・ステアロサーモフィラスDNAポリメラーゼ、サーモコカス・リトラリスDNAポリメラーゼ、サーマス・アクアチカスDNAポリメラーゼ、及びZ05DNAポリメラーゼを包含する。さらに、それらのDNAポリメラーゼを用いてDNA合成を行うための反応条件は、当業界において良く知られている。本発明の方法において有用であるためには、重合剤は、オリゴヌクレオチドを効果的に切断でき、そして検出できるシグナルが直接的に又は間接的に生成されるよう、ラベルされたフラグメントを開放できる5'ヌクレアーゼ活性を有すべきである。

## 【0216】

合成の生成物は、鋳型鎖及びプライマー延長鎖から成る重複体分子である。この合成の副生成物は、モノ - 、ジ - 及びオリゴ - ヌクレオチドフラグメントの混合物から成るプローブフラグメントである。好ましい態様においては、変性の反復されるサイクル、プローブ及びプライマーアニーリング、プライマー延長及びプローブの切断が行われ、プライマーにより定義される増幅された領域の指数的蓄積及びラベルされたフラグメントの指数的生成をもたらされる。そのような反復された熱サイクルは一般的に、ポリメラーゼ鎖反応 (PCR) として当業界において知られている。十分なサイクルが、陽性反応を区別するために十分な量のプローブの断片化を達成するために行われ、すなわち検出されるべき核酸が負の反応から存在し、すなわち検出されるべき核酸が存在しない。一般的に、陽性反応は、負の反応より大きな程度のシグナルを示すであろう。

## 【0217】

確かな好ましい態様においては、PCR反応は、熱安定性酵素を利用する自動化された工程として行われる。この工程においては、反応混合物は、変性段階、プローブ及びプライマーアニーリング段階、及び合成段階を通して循環され、それにより、切断及び置換がプライマー依存性鋳型延長と同時に生じる。熱サイクラー、例えばABI3700 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) (熱安定性酵素による使用のために特別に企画される) が使用され得る。本発明のそのような態様においては、検出されるべき核酸が、検出できるようラベルされたプローブの不在下で増幅され、続いて別の反応における増幅生成物が検出される。他方では、検出されるべき核酸が、プローブの存在下で増幅され、単一の反応での増幅及び検出が可能にされる。

## 【0218】

温度安定性ポリメラーゼは、二本鎖延長生成物を変性する好ましい手段が、PCRサイクルの間、それらを高い温度 (約95 ) に暴露することによるので、この自動化された工程において好ましい。例えば、アメリカ特許第4,889,818号は、サーマス・アクアチカスから単離される代表的な熱安定性酵素を開示する。追加の代表的な温度安定性ポリメラーゼは、例えば熱安定性細菌サーマス・フラバス (Thermus flavus)、サーマス・ルベル (Thermus ruber)、サーマス・サーモフィラス (Thermus thermophilus)、バチルス・ステアロサーモフィラス (Bacillus stearothermophilus) (列挙される他の温度よりも幾分低い最適温度を有する)、サーマス・ラクテウス (Thermus lacteus)、サーマス・ルベンス (Thermus rubens)、サーモトガ・マリチマ (Theriotoga maritima)、サーモコカス・リトラリス (Thermococcus littoralis)、メタノサーマス・フェルビダス (Methanotermus fervidus) 及びピロコカス・フリオサス (Pyrococcus furious) から抽出され

たポリメラーゼを包含する (Stratagene, La Jolla, CA)。上記のように、それらの熱安定性ポリメラーゼは、RNA鋳型からDNAを合成することができる。RNA分子が本発明の方法に従って検出される予定である場合、RNA鋳型からDNAを合成することができ、すなわち逆転写活性を有するDNAポリメラーゼが使用されるべきである。

【0219】

他の観点においては、本発明の方法はまた、サンプルにおける日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸の量を定量化するために使用され得る。そのような方法においては、上記のような5'ヌクレアーゼ反応が行われ、そして生成される蛍光の量が定量化される。蛍光の量は当業者に知られているいずれかの方法により定量化され得る。ある態様においては、放される蛍光の量は、フルオロメーターにより定量化され得る。蛍光の量が、対照反応により放される蛍光の量に比較され得る。

10

【0220】

対照反応は好ましくは、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの既知量の核酸を有するサンプルにより行われる反応と同じ試薬を用いて及び同じ時間で行われる。他方では、蛍光成分により放される蛍光の量が、ウイルス核酸濃度に対して蛍光をプロットする標準曲線に比較され得る。代表的な標準曲線は図6に示される。日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸の量を定量化するさらなるガイドは、公開されたアメリカ特許出願公開番号2002/0058262号、及びヨーロッパ特許第1138780号、第1138783号及び第1138784号に見出され得る。

【0221】

20

4.2.1 又は複数のプライマー及びプローブを使用する、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を検出するための他の方法：

上記5'ヌクレアーゼ反応の他に、本発明はさらに、下記のような、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を検出するために使用され得る他の方法を提供する。

【0222】

ある態様においては、核酸を検出するために2種の核酸プライマー及び核酸プローブを用いる、当業者により知られているいずれかの方法が、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を検出するために使用され得る。セクション3.1及び3.2に記載される核酸プライマー及びプローブは、当業者に知られているいずれかのそのような方法に使用され得る核酸プライマー及びプローブは、当業者に知られているいずれかのそのような方法に

30

【0223】

ウイルス核酸を検出するために使用され得る典型的な増幅反応は、ポリメラーゼ鎖反応 (PCR) 及び リガーゼ鎖反応 (LCR) (アメリカ特許第4,683,195号 及び第4,683,202号; PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications (Innisなど., eds, 1990)), 鎖置換増幅 (SDA) (Walker, など. Nucleic Acids Res. 20 (7): 1691-6 (1992); Walker PCR Methods Appl 3 (1) : 1-6(1993)), 転写 - 介在性 増幅 (Phyffer, など., J. Clin. Microbiol. 34: 834-841 (1996); Vuorinen, など., J. Clin. Microbiol. 33: 1856-1859 (1995)), 核酸配列に基づく増幅 (NASBA) (Compton, Nature 350 (6313): 91-2 (1991)), 回転増幅 (RCA) (Lisby, Mol. Biotechnol. 12 (1): 75-99 (1999)), Hatch など. Genet . Anal. 15 (2): 35-40 (1999)), 枝分かれ DNA シグナル増幅 (bDNA) (Iqbal など, Mol . Cell Probes 13 (4): 315-320 (1999)) 及び Q- レプリカーゼ (Lizardi など., Bio /Technology 6:1197 (1988))を包含する。

40

【0224】

そのような方法の1つの例は、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸の増幅、及び特定のピーコンであるプローブによる核酸の存在の検出である。そのようなプローブは、ヘアピンを形成できる相補的配列を端に有するハイブリダイズすることができる標的認識配列を含む。分子ピーコンは、蛍光成分、及びプローブの反対側の端に消光剤成分を有する。日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸への分子ピーコンのハイブリダイゼーションは、消光剤成分から蛍光成分を分離し、蛍光成分の検出を可能にし、そ

50

して従って、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸の存在を示す。本発明のいずれかのグループが、当業者がヘアピン構造体を形成できるものとして認識するプローブの5' 及び3' 末端上へのいくつかの残基の付加を伴って、そのような方法に使用され得る。分子ビーコンの選択及び使用のさらなるガイドは、引用により本明細書に組み込まれるTyagi and Kramer, 1996, Nat. Biotechnol. 14: 303-308による文献に見出される。

【0225】

さらにもう1つの例においては、本発明の2種のプライマー及びプローブが、核酸配列に基づく増幅を用いて、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を検出するために使用され得る。核酸配列に基づく増幅(NASBA)は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を検出するために使用され得る強力な増幅技法である。NASBA方法においては、次の3種の酵素が使用される：逆転写酵素、T7 RNAポリメラーゼ及びRNアーゼH。最終増幅生成物は、検出されるべき核酸の極性の反対の極性を有する一般鎖RNAである。

【0226】

増幅されたRNA生成物は、磁気粒子に結合される標的 - 特異的捕獲プローブ、並びにルテニウム - ラベルされた検出器プローブ、及び電気化学ルミネセント(ECL)を測定できる測定器(NucliSens Reader;bioMérieux)を通して検出され得る。他方では、NASBAにより増幅されたRNAは、上記のようにして、増幅反応に分子ビーコンプローブを含むことにより同時に特異的に検出され得る。本発明のプライマー及びプローブの使用のさらなるガイドは、引用により本明細書に組込まれるCompton, 1991, Nature 350:91- 92 及びKievits など., 1991, J. Virol. Methods 35:273-86による文献に見出され得る。

【0227】

そのような方法の他の例は、上記に集中的に記載される5'ヌクレアーゼ反応を包含する。そのような方法のもう1つの例は、本発明の2種のプライマーによる日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸の増幅、続く本発明のプローブによる、増幅された核酸の検出を包含する。日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を検出するために当業者により使用されるか又は適合され得るそのような方法のさらなる他の例は、引用により本明細書に組み込まれるアメリカ特許第6,403,339号, 第6,329,152号, 第5,952,202号, 及び 第5,387,510号に見出され得る。

【0228】

他の態様においては、核酸を検出するために核酸プライマー及び核酸プローブを用いる。当業者に知られているいずれかの方法が、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を検出するために使用され得る。セクション3.1及び3.2に記載される核酸プライマー及びプローブは、当業者に知られているいずれかのそのような方法に使用され得る。それらの方法においては、当業者は、本発明のプライマーがまた、プローブとして、及び本発明のプローブがプライマーとして使用され得ることを認識するであろう。

【0229】

例えば、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸は、固体支持体に結合される本発明のプライマーにハイブリダイズされ得る。次に、本発明の検出できるようラベルされたプローブは、検出されるべき核酸にハイブリダイズされ、それにより、核酸の存在が示される。他方では、プローブは、固体支持体に結合され、そして核酸を捕獲するために使用され、そして次に、プライマーが検出できるようラベルされ、そして核酸にハイブリダイズされ、それにより、核酸の存在を示す。個相に結合されるプローブを用いる方法、アメリカ特許第5,232,829号及びEP420260号に開示されている。

【0230】

日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を検出するために核酸プライマー及びプローブを使用する方法のもう1つの例は、超微粒子の使用を包含する。そのような方法においては、2種のオリゴヌクレオチド、例えば検出されるべき核酸の異なった領域にハイブリダイズできる本発明のプライマー又はプローブが、超微粒子に共有結合される。超微粒子は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸と、ハイブリダイゼーション条件下で接触される。

## 【 0 2 3 1 】

核酸が存在する場合、核酸は超微粒子に結合されるオリゴヌクレオチドに結合し、検出され得る大きな分子量の複合体を生成する。この複合体は、当業者に知られているいずれかの方法により検出され得る。ある態様においては、複合体は、その複合体の沈殿により検出される。本発明のプライマー及びプローブと共に、超微粒子を用いる方法についてのさらなるガイドは、Taton など、2000, Science 289 (5485): 1757-60 及びアメリカ特許第6,506,564号、第6,495,324号、第6,417,340号、第6,399,303号、及び第6,361,944号に見出され得る。

## 【 0 2 3 2 】

さらにもう1つの例においては、回転円増幅 (“RCA”) は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を検出するための方法の一部として使用され得る。RCA方法のある態様においては、DNA円が相補的プライマーのポリメラーゼ延長により増幅される。本発明のいずれかのプライマー又はプローブが、そのような方法に使用され得る。DNAを環化するための方法は、当業者において良く知られており、そして例えば、分子内連結を好む条件下でDNA分子の末端と一緒に連結することを包含する。次に、一本鎖生成物コンカテマー生成物が、当業者に知られている核酸を検出するためのいずれかの方法により検出され得る。例えば、コンカテマー生成物は、本発明の検出できるラベルされたプローブを用いて検出され得る。

## 【 0 2 3 3 】

既知の配列の核酸を検出する方法の他の例は、本明細書に集中的に記載されている。RCAの他の態様においては、コンカテマー生成物に対して相補的である第2プライマーが使用され得る。このプライマーは、環状DNA鋳型に存在する配列の指数増幅を可能にする。増幅生成物は例えば、本発明の検出できるようラベルされたプローブを用いることにより検出され得る。日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を検出するためのRCA方法におけるプライマー及びプローブの使用についてのさらなるガイドは、引用により本明細書に組み込まれる、アメリカ特許第6,344,329号、第6,350,580号、第6,221,603号、第6,210,884号、第5,648,245号、及び第5,714,320号、及び国際特許公開番号WO95/35390号に見出され得る。

## 【 0 2 3 4 】

そのような方法のさらにもう1つの例は、上記の重合 - 無関係5'ヌクレアーゼ反応である。日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーを検出するために当業者により使用されるか又は適合され得るプライマー及びプローブを用いる方法のさらに他の方法は、引用により本明細書に組み込まれるアメリカ特許第6,316,200号、第6,268,128号、第6,180,338号、第5,716,784号、及び第5,573,906号に記載される。

## 【 0 2 3 5 】

ある態様においては、核酸を検出するために核酸を増幅できる2種の核酸プライマーを用いる、当業者により知られているいずれかのアッセイが、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を検出するために使用され得る。セクション3.1に記載される核酸プライマーは、当業者に知られているいずれかのそのような方法に使用され得る。さらに、当業者は、本発明のプローブがまた、それらの方法においてプライマーとして使用され得ることを理解するであろう。

## 【 0 2 3 6 】

そのような方法の1つの例においては、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸が、分子の5'末端で蛍光成分及び消光剤成分を含むヘアーピン構造体を含んで成る少なくとも1つのプライマーにより核酸を増幅することにより検出され得る。次に、増幅生成物中へのプライマーの組込みが、消光剤成分から蛍光成分を分離し、蛍光成分の検出を可能にする。蛍光成分の検出は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸の存在を示す。当業者は、必要なヘアーピン構造体を形成するためにプライマー又はプローブにおける追加の残基を組込むことにより、そのような方法への本発明のプライマー又はプローブの使用を容易に認識するであろう。そのようなプライマー及びプローブの企画及び選

10

20

30

40

50

扱のさらなるガイドは、引用により本明細書に組込まれるNazerenkoなど., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 2516-2521 及びThelwell など., 2000, Nucleic Acids Res. 28: 3752-3761に見出され得る。

【0237】

そのような方法のもう1つの例においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、鎖置換増幅(“SDA”)を用いて検出され得る。そのような方法においては、増幅された日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、蛍光成分、消光剤成分、及びそれらの2種の成分を分離する構築された制限部位を含んで成る一本鎖プライマーの組込みにより検出される。当業者は、SDAへの使用のために本発明のプライマー又はプローブのいずれかをいかにして修飾するかを容易に理解することができる。

10

【0238】

SDAに使用される第1の増幅反応においては、プライマーは、例えばチオ-dCTPの存在下で日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を増幅するために使用され、それにより、増幅生成物中にプライマーが組込まれる。次に、制限エンドヌクレアーゼが、プライマーにおける制限部位にニックを入れるために使用され得る。制限エンドヌクレアーゼは、増幅生成物におけるチオ-dCTPの組込みのために、増幅生成物の両鎖を切断することはできない。最終的に、ニックにより創造されるプライマーの3'末端は、新規の重合反応を増強するために使用され、それにより、鋳型鎖から3'側のニックの鎖を置換する。

【0239】

鎖の置換は、消光剤生成物から蛍光成分を分離し、それにより、蛍光成分により放される蛍光の消光を妨げる。日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、蛍光の存在及び/又は量を測定することにより検出され、そして/又は定量化され得る。SDAへの使用のためのプライマー及びプローブの選択及び修飾に対するさらなるガイドは、引用により本明細書に組み込まれる。Little など., 1999, Clin. Chem. 45:777-784 及びアメリカ特許第6,528, 254 号及び第6,528, 632号に見出され得る。

20

【0240】

もう1つの例においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、転写-介在性増幅(“TMA”)を用いて検出され得る。TMAは、検出されるべき核酸を増幅するためにRNAポリメラーゼ及び逆転写酵素を使用するRNA転写増幅システムである。前記方法においては、RNAポリメラーゼのためのプロモーターと共に本発明のプライマーは、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーのRNAの逆転写を増強するために使用される。次に、逆転写酵素のRNAアーゼ活性が、RNA鋳型を分解し、cDNA鎖を開放する。第2鎖の合成は、本発明の第2プライマーにより増強され、そして逆転写酵素により触媒される。次に、RNAポリメラーゼは、第2鎖において合成されるプロモーターを認識し、そして第2鎖からのRNA転写の多数のサイクルを触媒する。次に、RNA生成物が検出されるか、又はもう1つの段階の増幅のための鋳型として作用することができる。

30

【0241】

次に、TMAのRNA生成物が、当業者に知られているいずれかの方法により検出され得る。ある態様においては、RNA生成物は、本発明のプローブにより検出され得る。他の態様においては、RNA生成物は、アクリジン-エステルラベルによりラベルされた本発明のプローブにより検出され得る(Gen-Probe, Inc., San Diego, CA)。そのようなラベルはハイブリダイズされていないプローブから化学的に除去され、そしてハイブリダイズされたプローブ上のラベルは妨げられないまま存続する。従って、そのような態様においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸の存在が、アクリジン-エステルラベルの存在を検出することにより検出され得る。TMAに基づく方法への本発明のプライマー及びプローブの使用における追加のガイドは、引用により本明細書に組み込まれる、Arnold など., 1989, Clin. Chem. 35: 1588-1594, Miller など., 1994, J. Clin. Microbiol. 32:393-397, 及びアメリカ特許第6,335, 166号 及び第6,294, 338号に見出され得る。

40

【0242】

さらにもう1つの例においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸が、

50

診断PCRを用いて検出され得る。そのような方法においては、検出されるべき核酸の存在は、PCR生成物の好都合な鋳型 - 依存性増幅により示される。一般的に、PCR生成物の識別は、PCR生成物のサイズから決定され；決定されるべき核酸の好都合な増幅は一般的に、既知サイズのPCR生成物をもたらす。

#### 【 0 2 4 3 】

核酸、例えばPCR生成物のサイズを決定するための方法は、当業界において良く知られており、そして例えば、中でもゲル及び毛管電気泳動を包含する。日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの存在を表わす、PCR生成物の好都合な増幅を検出するための他の方法は、非特異的DNA結合色素の使用を包含する。例えば、SYBR Green (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) は、PCRの間に生成されるいずれかの二本鎖DNAの検出及び定量化を可能にする増幅反応に包含され得る。そのような方法の例は、引用により本明細書に組込まれるアメリカ特許第6,323,337号及び第5,863,753号に見出され得る。

10

#### 【 0 2 4 4 】

最終的に、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーを検出するために本発明のプライマー及びプローブを使用する、当業者により使用されるか又は適合され得る他の方法は、引用により本明細書に組み込まれる、アメリカ特許第6,528,632号、第6,475,729号、第6,361,944号、第6,329,152号、第6,270,967号、第6,258,546号、第6,063,603号、第6,057,099号、第6,040,166号、第5,914,230号、第5,843,650号、第5,747,255号、第5,747,251号、第5,731,146号、第5,712,386号、第5,635,347号、第5,554,517号、第5,409,818号、第5,384,242号、第4,965,188号、第4,868,104号、第4,800,159号、及び第4,683,195号に記載される。

20

#### 【 0 2 4 5 】

他の態様においては、核酸を検出するために核酸にハイブリダイズすることができる単一核酸プライマー又はプローブを使用する、当業者により知られているいずれかのアッセイが、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を検出するために使用され得る。セクション3.1及び3.2に記載される核酸プライマー及びプローブは、当業者に知られているいずれかのそのような方法に使用され得る。さらに、当業者は、本発明のプライマーがまた、プローブとして使用され、そして本発明のプローブが記載される方法においてプライマーとして使用され得ることを認識するであろう。

#### 【 0 2 4 6 】

例えば、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、プライマー延長反応を開始するために、プライマーを用いて検出され得る。核酸ポリメラーゼによるプライマーの好都合な延長は、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸の存在を示す。日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの存在を示すプライマー延長生成物は、当業者に知られているいずれかの方法により検出され得る。例えば、プライマー延長反応は、<sup>32</sup>P-ラベルされたヌクレオチドを組込むことができる。

30

#### 【 0 2 4 7 】

日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーを検出するために、当業者により記載されるか又は適合されるようにして使用され得る方法を記載する単一プライマー又はプローブ検出方法の他の例は、引用により本明細書に組込まれる、アメリカ特許第6,440,707号、第6,379,888号、第6,368,803号、第6,365,724号、第6,361,944号、第6,352,827号、第6,326,145号、第6,312,906号、第6,268,128号、第6,261,784号、第6,177,249号、第6,140,055号、第6,130,047号、第6,124,090号、第6,121,001号、第6,110,677号、第6,054,279号、第6,022,686号、第5,981,176号、第5,958,700号、第5,945,283号、第5,935,791号、第5,919,630号、第5,888,739号、第5,888,723号、第5,882,867号、第5,876,924号、第5,866,336号、第5,856,092号、第5,853,990号、第5,846,726号、第5,814,447号、第5,808,036号、第5,800,989号、第5,795,718号、第5,792,614号、第5,710,028号、第5,683,875号、第5,683,872号、第5,679,510号、第5,641,633号、第5,597,696号、第5,595,890号、第5,571,673号、第5,547,861号、第5,525,462号、第5,514,546号、第5,491,063号、第5,437,977号、第5,294,534号、第5,118,605号、第

40

50

5,102,784号,第4,994,373号,第4,851,331号,第4,767,700号,及び第4,683,194号に見出され得る。

【0248】

上記に引用されるアメリカ特許は、1又は2種のプライマーのいずれか、又は1又は2種のプライマー及びプローブのいずれかを使用することができる方法を開示する。上記の記載は、そのような方法を分類することを意味しない。単一のプライマーを用いて核酸を検出するための方法を提供するものとして記載されるアメリカ特許に提供される2種のプライマーはまた、引用により組込まれ、そして本発明のプライマー、プローブ及びキットと共に使用され得る。

【0249】

10

#### 4.3. 日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸及び一定の他のフラビウィルスを 用いて検出するための方法：

上記日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を検出するためのアッセイの他に、本発明はさらに、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸及び一定の他のフラビウィルスを検出するための方法を提供する。それらの方法に従って検出され得るフラビウィルスは、上記セクション3.4に記載される。

【0250】

ある態様においては、核酸を検出するために核酸プローブを用いる、当業者に知られているいずれかの方法が、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸及び一定の他のフラビウィルスを検出するために使用され得る。日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸、及び一定の他のフラビウィルスを検出するために使用され得る核酸プローブは、上記セクション3.2.に記載されている。

20

【0251】

ある態様においては、本発明のプローブは、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸及び一定の他のフラビウィルスのウィルス配列が、プローブがサンプルに存在するウィルス配列に結合するかどうかを決定することにより、サンプルに存在するかどうかを決定するために使用され得る。例えば、検出は、ドットプロット形式を用いて達成され得る。ドットプロット形式においては、ラベルされていない、増幅されたサンプルが、固体支持体、例えば膜に結合され、前記膜がラベルされたプローブにと共に、適切なハイブリダイゼーション条件下でインキュベートされ、ハイブリダイズされていないプローブが洗浄により除去され、そしてフィルターが結合されたプローブの存在についてモニターされる。多数のサンプルが単一プローブにより分析される場合、ドットプロット形式は非常に有用である。多くのサンプルが単一の膜上の別々の位置で固定され、そしてプローブの溶液に前記膜を浸すことにより同時にハイブリダイズされ得る。

30

【0252】

多数の異なったプローブが使用される予定である場合、非常に有用である他の方法は、増幅された配列がラベルを含み、そしてプローブが固体支持体に結合されている“逆方向”ドットプロット形式である。この形式は、本発明のアッセイ方法が1つのサンプルに対して同時に行われるべき一連の方法の1つとして使用される場合に有用である。この形式においては、ラベルされていないプローブが膜に結合され、そしてラベルされたサンプルに適切な緊縮ハイブリダイゼーション条件下で暴露される。次に、ハイブリダイズされていないラベルされたサンプルが、適切な緊縮条件下での洗浄により除去され、そして次に、フィルターが結合された配列の存在についてモニターされる。

40

【0253】

前方向及び逆方向ドットプロットアッセイの両者は従来、マイクロタイタープレートにおいて行われた；特許を付与されたアメリカ特許第5,232,829号である、1989年9月29日に出願されたアメリカ特許出願第414,542号のCIPである、1991年5月3日に出願されたアメリカ特許出願第695,072号を参照のこと（それらは引用により本明細書に組込まれる）。プローブは、マイクロタイタープレートに付着され、それにより、プローブを固定する、ウシ血清アルブミン（BSA）に結合され得る。

50



## 【 0 2 5 4 】

日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸及び一定の他のフラビウィルスを検出するために本発明のプローブを用いる方法のもう1つの例は、膜に結合される核酸を検出するための方法を提供し、そして引用により本明細書に組み込まれるアメリカ特許第6,383,756号に記載されている。

## 【 0 2 5 5 】

もう1つの例においては、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸は、枝分かれされた - DNAに基づく方法を用いて検出され得る。そのような方法においては、デンドリマーモノマーは、個々の鎖の中央部分に位置する配列相補性の領域を共有する2本のDNA鎖から構成される。2本の鎖がモノマーを形成するためにアニーリングする場合、その得られる構造体は4本の一本鎖末端により境界を有する中央の二本鎖中心を有する。デンドリマーは、多くの一本鎖末端を自由にしながら、お互いへのモノマーの一本鎖末端のハイブリダイゼーションにより、モノマーからアセンブルされ得る。それらの自由一本鎖末端は、本発明のプライマー又はプローブのいずれかの配列を有することができる。デンドリマーは、本発明のプローブに関して上記に記載されるように、当業者に知られているいずれかの検出できる成分により検出できるようラベルされ得る。

## 【 0 2 5 6 】

次に、デンドリマーは、例えば下記に記載される“ドットプロット”アッセイにおいてプローブとして使用され得る。さらに、デンドリマーは、プローブが直接的に検出される、当業者に知られているいずれかの方法においてプローブとして使用され得る。プローブは、そのプローブの存在がいずれかの続く反応又は修飾、例えばドットプロット又はザンハイブリダイゼーションを伴わないで決定され得る場合、直接的に検出される。日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸又は他の検出できるフラビウィルスを検出するためにプローブとしてのデンドリマーの選択及び使用に対する追加のガイドは、引用により本明細書に組込まれる、アメリカ特許6,261,779号、及びNilsen など. , 1997, J. Theoretical Biology 187 : 273-284, Capaldi など. , 2000, Nucleic Acids Res. , 28 (7) : 21e, Wang など. , 1998, J. Am. Chem. Soc. 120: 8281-8282, 及び Wang など. , 1998, Electroanalysis 10 (8): 553-556に見出され得る。

## 【 0 2 5 7 】

当業者は、本発明のプローブが、本発明のプローブにより検出され得るウィルスに対して選択的にハイブリダイズするいずれかのプライマーと組合して使用され得ることを認識するであろう。従って、検出できるフラビウィルスに対して選択的にハイブリダイズするいずれかのプライマーと組合しての、本発明のプローブにより検出できるフラビウィルスを検出する方法は、本発明の範囲内であると思われる。

## 【 0 2 5 8 】

上記セクション4.2に記載される日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を検出するために使用され得る単一のプライマー又はプローブを使用するいずれかの方法は、上記セクション3.4に記載される他のフラビウィルスを検出するために本発明のプローブと共に使用され得る。

## 【 0 2 5 9 】

5. キット :

もう1つの観点においては、本発明は、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸及び/又は一定の他のフラビウィルスを検出するために使用されるキットを提供する。本発明のキットにより検出され得る日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーは、上記セクション3.3に記載されており、そして本発明のキットにより検出され得る他のフラビウィルスの核酸は、上記セクション3.4に記載されている。

## 【 0 2 6 0 】

ある態様においては、キットは、本発明のプローブを含んで成る。いくつかの態様においては、キットは本発明のプライマーを含んで成る。いくつかの態様においては、キットは、本発明の1又は複数のプライマー及びプローブの組合せを含んで成る。

## 【 0 2 6 1 】

例えば、1つの態様においては、キットは、配列番号1の核酸にハイブリダイズする第1の核酸プライマー、及び配列番号9の核酸にハイブリダイズする第2の核酸プライマーを含んで成る。他の態様においては、キットは、配列番号29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、又はその相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含んで成るプライマー（例えば、少なくとも1つの上流及び/又は1つの下流プライマー）を含んで成る。典型的なプライマーは、例えば配列番号64、65、66及び67から選択され得る。

## 【 0 2 6 2 】

いくつかの態様においては、キットは、配列番号41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54又は55から選択された少なくとも1つの上流及び/又は下流プライマーを含んで成る。

10

他の態様においては、キットは、配列番号56、57、58、59、60、61、62又は63から選択された少なくとも1つの上流及び/又は1つの下流プライマーを含んで成る。

いくつかの上記態様においては、キットはまた、本明細書に記載されるように、配列番号16又はその相補体の核酸にハイブリダイズする核酸プローブを含んで成る。

## 【 0 2 6 3 】

ある態様においては、キットは、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を検出するために2種の核酸プライマー及び核酸プローブを含んで成る。本発明のキットの成分である核酸プライマーは、上記セクション3.1に集中的に記載されており、そして本発明のキットの成分である核酸プローブは、上記セクション3.2に記載されている。プローブは任意には、上記のようにしてラベルされ得る。ある態様においては、キットは熱安定性DNAポリメラーゼを含んで成る。ある態様においては、熱安定性DNAポリメラーゼは逆転写活性を有する。ある態様においては、キットは、本発明の方法に従って、検出できるフラビウシスの核酸を検出するための説明書を包含する。他の態様においては、キットは、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーを検出するための説明書を包含する。他の態様においては、キットは、キット中の成分を保持するための1又は複数の容器を包含する。

20

## 【 0 2 6 4 】

ある態様においては、キットは、本発明のプライマーを含んで成る組成物を含むことができる。キットはまた、本発明のプローブを含んで成る組成物を含むことができる。キットはさらに、熱安定性DNAポリメラーゼを含んで成る組成物を含むことができる。本発明のプライマー又はプローブ、又は熱安定性DNAポリメラーゼを含んで成る組成物はさらに、追加の試薬を含んで成る。例えば、前記組成物は、組成物の分解を妨げるための適切な保存剤、組成物のpHを調節するための適切な緩衝液、組成物の粘度を変えるための適切な稀釈剤、及び同様のものを包含する。

30

## 【 0 2 6 5 】

キットはさらに、上記のように、5'ヌクレアーゼ反応を行うための他の試薬を含むことができる。さらに、キットは、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸の存在を示す断片化されたプローブの検出を促進するための試薬を含んで成る。定義される配列の核酸を検出するために使用され得るキットは、引用により本明細書に組み込まれる、アメリカ特許第6,514,736号、第6,197,563号、第6,040,166号、及び第5,641,864号に記載される。当業者は、本発明の範囲内にある追加のキットを企画するためにそれらのアメリカ特許の開示を改良するために、本発明のプライマー及びプローブを容易に使用することができる。

40

## 【 0 2 6 6 】

要約すると、本発明は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を検出するための方法に向けられ、ここで前記方法は、

a) サンプルと、配列番号16又はその相補体の核酸にハイブリダイズする、検出できるようラベルされた核酸プローブ、配列番号1又はその相補体の核酸にハイブリダイズするプライマー、及び5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する鋳型-依存性核酸ポリメラー

50

ぜとを、前記鋳型 - 依存性核酸ポリメラーゼによる、前記検出できるようラベルされた核酸プローブの断片化を可能にする条件下で接触せしめ；そして

b) 前記検出できるようラベルされた核酸プローブの断片化を検出し、ここで前記断片化が日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸の存在を示すことを含んで成る。

【0267】

好ましい態様においては、検出できるようラベルされたプローブは、配列番号17、18、28又はその相補体のいずれかの少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含んで成る。好ましくは、検出できるようラベルされたプローブは、蛍光成分を含んで成る。蛍光成分は、フルオレセイン - ファミリー色素、ポリハロフルオレセイン - ファミリー色素、ヘキサクロロフルオレセイン - ファミリー色素、クマリン - ファミリー色素、ローダミン - ファミリー色素、シアニン - ファミリー色素、オキサジン - ファミリー色素、チアジン - ファミリー色素、スクアライン - ファミリー色素、キレート化されたランタニド - ファミリー色素及びBODIPY (商標) - ファミリー色素から成る群から選択され得る。非常に好ましい蛍光成分は、6 - カルボキシフルオレセインである。

【0268】

TaqMan (商標) アッセイの好ましい態様においては、検出できるようラベルされたプローブはさらに、消光剤成分を含んで成る。消光剤成分は好ましくは、フルオレセイン - ファミリー色素、ポリハロフルオレセイン - ファミリー色素、ヘキサクロロフルオレセイン - ファミリー色素、クマリン - ファミリー色素、ローダミン - ファミリー色素、シアニン - ファミリー色素、オキサジン - ファミリー色素、チアジン - ファミリー色素、スクアライン - ファミリー色素、キレート化されたランタニド - ファミリー色素、BODIPY (商標) - ファミリー色素、及び非蛍光消光剤成分から成る群から選択され得る。最も好ましい消光剤成分はCy5<sup>TM</sup>である。

【0269】

好ましい非蛍光消光剤成分は、BHQ<sup>TM</sup> - ファミリー色素、Iowa Blacks<sup>TM</sup> 又はDabcylから成る群から選択される。最も好ましい非蛍光消光剤成分は、BHQ<sup>TM</sup>-1, BHQ<sup>TM</sup>-2, 及びBHQ<sup>TM</sup>-3から成る群から選択される。TaqMan (商標) アッセイにおいては、5' - 3' ヌクレアーゼ活性を有する鋳型 - 依存性核酸ポリメラーゼによる、検出できるようラベルされたプローブの断片化は、消光剤成分から蛍光成分を分離する。好ましくは、プローブの断片化は、レーザー誘発された蛍光により検出される。より好ましくは、蛍光成分は、消光剤成分に対して位置し、その結果、蛍光成分により放される光子は、プローブが損なわれていないが、しかし5' - 3' - ヌクレアーゼ活性を有する酵素によるプローブの断片化が消光剤成分から蛍光分離を分離する場合、消光剤成分により吸収され、その結果、蛍光成分により放される光子が検出され得る。

【0270】

1つの方法においては、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸が、配列番号1の核酸にハイブリダイズする核酸を含んで成る第1のプライマーにより増幅される。より好ましくは、核酸は、配列番号2の少なくとも16個の連続したヌクレオチドを含んで成る第1のプライマーにより増幅される。最も好ましくは、第1のプライマーは、配列番号3又は8を含んで成る。

【0271】

修飾された残基が使用される場合、好ましくは配列番号8の位置23での残基はN<sup>6</sup> - アルキル - デオキシアデノシンであり、又は配列番号8の位置23での残基はN<sup>6</sup> - メチル - デオキシアデノシンであり、又は配列番号8の位置24での残基はN<sup>6</sup> - アルキル - デオキシアデノシンであり、最も好ましくは、N<sup>6</sup> - tert - ブチル - ベンジル - デオキシアデノシンである。より好ましくは、配列番号8の位置23での残基はN<sup>6</sup> - メチル - デオキシアデノシンであり、そして配列番号8の位置24での残基はN<sup>6</sup> - tert - ブチル - ベンジル - デオキシアデノシンである。

【0272】

好ましくは、第2のプライマーは、配列番号9の核酸にハイブリダイズする核酸、より

10

20

30

40

50

好ましくは、配列番号10の少なくとも16個の連続ヌクレオチド、最も好ましくは配列番号11又は15を含んで成る。修飾された残基が使用される場合、好ましくは第2のプライマーは、配列番号15の位置24でN<sup>6</sup>-アルキル-デオキシアデノシン、最も好ましくはN<sup>6</sup>-tert-ブチル-ベンジル-デオキシアデノシンを含んで成る。

【0273】

本発明のオリゴヌクレオチドは、上記のような方法に使用されるプライマー及びプローブである。それらの位置及び配列に依存して、プライマーはプローブとして使用され得、又は逆も真である。好ましいオリゴヌクレオチドは、配列番号2, 9及び17又はそれらの相補体のいずれかに含まれる少なくとも16個の連続ヌクレオチドを含む。他の好ましいオリゴヌクレオチドは、配列番号3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 及び 28、又はそれらの相補体のいずれかに含まれる少なくとも16個の連続ヌクレオチドを含む。

10

【0274】

好ましいキットは、上記に言及されるような好ましいオリゴヌクレオチドを含んで成る。より好ましくは、キットは、下記成分を含んで成る：

a) 配列番号1又はその相補体の核酸にハイブリダイズする第1の核酸プライマー；

b) 配列番号9又はその相補体の核酸にハイブリダイズする第2の核酸プライマー；及び

【0275】

c) 配列番号16又はその相補体の核酸にハイブリダイズする核酸プローブ。最も好ましいキットは、任意には又は好ましくは、上記のようにしてラベルされ、そして修飾された、好ましいプライマー及びプローブを含んで成る。さらに、キットはさらに、熱安定性DNAポリメラーゼを含んで成る。そのような熱安定性DNAポリメラーゼは逆転写活性を有することができる。逆転写活性を有するこのDNAポリメラーゼは、カルボキシドサーマス・ヒドロゲンホルムスDNAポリメラーゼ、サーモシフォ・アフリカナスDNAポリメラーゼ、バチルス・パアリダスDNAポリメラーゼ、サーマス種Z05 DNAポリメラーゼ、サーマス・アクアチカスDNAポリメラーゼ、サーマス・サーモフィラスDNAポリメラーゼ及びサーマス種17 DNAポリメラーゼから成る群から選択される。

20

【0276】

キットはさらに、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を検出するための説明書を包含する。

30

本発明のもう1つの対象は、配列番号1又はその相補体の核酸にハイブリダイズする核酸プライマー及び緩衝液を含んで成る、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーを検出するための組成物である。好ましいプライマー及びプローブは上記に記載される通りである。

【0277】

本発明のもう1つの対象は、サンプル中の日本脳炎ウイルス血清グループのメンバー又はデング熱ウイルス、黄熱病ウイルス、モンタナ筋炎白質脳炎ウイルス、又はモドックウイルスの核酸の検出方法であり、ここで前記方法は、

a) 前記サンプルと、配列番号16にハイブリダイズする核酸プローブとを接触せしめ；そして

40

b) 日本脳炎ウイルス血清グループのメンバー又はデング熱ウイルス、黄熱病ウイルス、モドックウイルス又はモンタナ筋炎白質脳炎ウイルスの核酸への前記核酸プローブのハイブリダイゼーションを検出し、それにより、日本脳炎ウイルス血清グループのメンバー又はデング熱ウイルス、黄熱病ウイルス、モドックウイルス又はモンタナ筋炎白質脳炎ウイルスの核酸の存在を検出することを含んで成る。

【0278】

本発明のもう1つの対象は、サンプル中の日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸の検出方法であり、ここで前記方法は、

a) 前記日本脳炎ウイルス血清グループのメンバーの核酸を、配列番号16にハイブリダ

50

イズする核酸グロブ、及び5' 3' エキソヌクレアーゼ活性を有する鋳型 - 依存性DNAポリメラーゼの存在下で増幅し；そして

b) 前記プローブの断片化を検出し、それにより、前記日本脳炎ウィルス血清のグループのメンバーの核酸の存在を検出することを含んで成る。

【0279】

本発明のもう1つの対象は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸の検出方法であり、ここで前記方法は、

a) サンプルと、固体支持体に共有結合される、配列番号1、9、16又は29のいずれかにハイブリダイズする核酸プライマー又はプローブとを、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸による前記核酸プライマー又はプローブのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、接触せしめ；

b) 前記固体支持体に共有結合される同じプライマー又はプローブではない、配列番号1、9、16又は29のいずれかにハイブリダイズする、検出できるようラベルされたプライマー又はプローブと接触せしめ；そして

c) 前記日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸への前記検出できるようラベルされたプライマー又はプローブのハイブリダイゼーションを検出することにより、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を検出することを含んで成る。

【0280】

本発明のもう1つの対象は、サンプル中の日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸の量を定量化するための方法であり、ここで前記方法は、

a) 日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーを検出するために、サンプルと、配列番号16又はその相補体にハイブリダイズする、蛍光ラベルされた核酸プローブ、及び5' 3' エキソヌクレアーゼ活性を有する鋳型 - 依存性核酸ポリメラーゼとを接触せしめ；

b) 前記蛍光ラベルされた核酸プローブの断片化の量を、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性を有する鋳型 - 依存性核酸ポリメラーゼにより検出し、ここで前記蛍光ラベルされたプローブの断片化の量がサンプルに依存する日本脳炎血清グループのメンバーの核酸の量に比例し；そして

c) 対照反応における蛍光ラベルされたプローブにより放される蛍光の量に、蛍光ラベルされたプローブにより放される蛍光の量を比較することにより、蛍光ラベルされたプローブの断片化の量を決定することを含んで成る。

【0281】

本発明のもう1つの対象は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸の検出方法であり、ここで前記方法は、

a) 日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸を増幅し；

b) 前記日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの増幅された核酸に、配列番号16にハイブリダイズする、検出できるようラベルされたプローブをハイブリダイズし；そして

c) 前記検出できるラベルされたプローブを検出し、それにより、日本脳炎血清グループのメンバーの核酸を検出することを含んで成る。

【0282】

本発明のもう1つの対象は、配列番号29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39及び40を含んで成る単離されたポリヌクレオチドである。

本発明のもう1つの対象は、配列番号29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39及び40を含んで成るポリヌクレオチドを含んで成るベクターである。

【0283】

本発明のさらなる対象は、配列番号29又はその相補体、配列番号30又はその相補体、配列番号31又はその相補体、配列番号32又はその相補体、配列番号33又はその相補体、配列番号34又はその相補体、配列番号35又はその相補体、配列番号36又はその相補体、配列番号37又はその相補体、配列番号38又はその相補体、配列番号39又はその相補体、又は配列番号40又はその相補体にハイブリダイズする少なくとも10個の連続したヌクレオチドの配列を含んで成るオリゴヌクレオチドである。前記オリゴヌクレオチドは好ましくは、100

10

20

30

40

50

個よりも少ないヌクレオチドを有する。より好ましくは、オリゴヌクレオチドは、配列番号68、又は配列番号69の相補体にハイブリダイズする、そして/又は配列番号64、65、66及び67から成る群から選択される配列を含んで成る。さらにより好ましくは、オリゴヌクレオチドは、配列番号64、65、66及び67から成る群から選択される。最も好ましくは、オリゴヌクレオチドは、配列番号64、65、66及び67から成る群から選択され他オリゴヌクレオチドである。

【0284】

本発明のもう1つの対象は、上記オリゴヌクレオチドのいずれかを含んで成る反応混合物である。前記反応混合物は好ましくは、さらに配列番号16又はその相補体にハイブリダイズする、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチド、より好ましくは上記に記載されるようなラベルされたプローブのいずれかを、好ましくはTaqMan（商標）アッセイ使用のために含んで成る。最も好ましくは、反応混合物は、DNAポリメラーゼを含んで成る。

10

【0285】

本発明のもう1つの対象は、

配列番号29又はその相補体、配列番号30又はその相補体、配列番号31又はその相補体、配列番号32又はその相補体、配列番号33又はその相補体、配列番号34又はその相補体、配列番号35又はその相補体、配列番号36又はその相補体、配列番号37又はその相補体、配列番号38又はその相補体、配列番号39又はその相補体、又は配列番号40又はその相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含んで成る少なくとも1つのオリゴヌクレオチドにより、セントルイス脳炎ウィルスの核酸を、前記オリゴヌクレオチドからのヌクレオチド配列の少なくとも一部の増幅の開始を可能にする条件下で増幅し；そして

20

【0286】

前記増幅された核酸を検出し、それにより、セントルイス脳炎ウィルスを検出することを含んで成る、セントルイス脳炎ウィルスの検出方法である。好ましくは、前記オリゴヌクレオチドは、配列番号64、65、66及び67から成る群から選択された配列を含んで成り、そしてより好ましくは、配列番号64、65、66及び67から成る群から選択される。最も好ましくは、オリゴヌクレオチドは、配列番号68、又は配列番号69の相補体にハイブリダイズする。オリゴヌクレオチドは好ましくは、100個よりも少ないヌクレオチドを有する。配列番号64及び65から成る群から選択されたプライマー、及び配列番号66及び67から成る群から選択されたプライマーを用いる方法が好ましい。

30

【0287】

前記方法は好ましくは、セントルイス脳炎ウィルスの核酸の増幅された核酸に、配列番号16にハイブリダイズする検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドをハイブリダイズし；そして増幅された核酸へのプローブのハイブリダイゼーションを検出することを含んで成る検出段階を含んで成る。好ましいプローブは上記に記載されている。好ましくは、増幅された核酸の量は、増幅段階の間に決定される。TaqMan（商標）方法が最も好ましい。

【0288】

本発明のもう1つの対象は、前記方法に関して上記に言及されるオリゴヌクレオチドを含んで成るキットである。

40

本発明のもう1つの対象は、配列番号56、57、58、59、60、61、62及び63から成る群から選択された配列を含んで成るオリゴヌクレオチドである。好ましいオリゴヌクレオチドは、配列番号56、57、58、59、60、61、62及び63から成る群から選択される。

【0289】

もう1つの対象は、それらのオリゴヌクレオチドを含んで成る、好ましくはさらに、配列番号25又はその相補体にハイブリダイズする、検出できるラベルされたオリゴヌクレオチドを含んで成る反応混合物である。より好ましくは、前記検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、配列番号16又はその相補体にハイブリダイズする。最も好ましくは、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、配列FGGTCTAGAI GGTTAGAGAGA

50

CCCTCCAGを含んで成り、ここでFはCY5であり；IはFAMであり；PはPO<sub>4</sub>であり；UはプロピニルdUであり；そしてEは5 - メチル - dCである。好ましくは、反応混合物は少なくとも1つの上流プライマー及び少なくとも1つの下流プライマーを含んで成る。

【0290】

本発明のもう1つの対象は、配列番号56、57、58、59、60、61、62及び63から成る群から選択された配列を含んで成る、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドにより、セントルイス脳炎ウィルスの核酸を、前記オリゴヌクレオチドからのヌクレオチド配列の少なくとも一部の増幅の開始を可能にする条件下で増幅し；そして前記増幅された核酸を検出し、それにより、黄熱病ウィルスを検出することを含んで成る、黄熱病ウィルスの検出方法である。より好ましくは、オリゴヌクレオチドは、配列番号56、57、58、59、60、61、62及び63から成る群から選択される。

10

【0291】

好ましくは、検出段階は、配列番号25又はその相補体にハイブリダイズする検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドを、黄熱病の核酸の増幅された核酸にハイブリダイズし；そして増幅された核酸への検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することを含んで成る。前記検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは好ましくは、F-5'-GGTCTAGAIGGTTAGAGGAGACCCTCCAG-3'-P（ここでFはCY5であり；IはFAMであり、そしてPはPO<sub>4</sub>である）を含んで成り；又は配列番号16又はその相補体にハイブリダイズする。

【0292】

20

好ましくは、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、配列番号17又はその相補体の少なくとも20個の連続したヌクレオチドを含んで成り、配列番号18又はその相補体を含んで成り、配列番号28又はその相補体を含んで成る。好ましいTaqMan（商標）アッセイに関しては、検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは好ましくは、蛍光成分及び消光剤生成を含んで成る。好ましくは、増幅された核酸の量は、増幅段階の間に決定され、それにより、サンプル中のウィルスを定量化する。

【0293】

黄熱病ウィルスを検出するためのキットは、前記方法について上記に言及されるオリゴヌクレオチドを含んで成る。

本発明のもう1つの対象は、配列番号41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54及び55から成る群から選択された配列を含んで成るオリゴヌクレオチドである。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、配列番号41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54及び55から成る群から選択される。

30

本発明のもう1つの対象は、そのようなオリゴヌクレオチドを含んで成る反応混合物である。好ましくは、オリゴヌクレオチドは検出できるラベルを含んで成る。

【0294】

本発明のもう1つの対象は、配列番号41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54及び55から成る群から選択された配列を含んで成る、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドにより、デング病ウィルスの核酸を、前記オリゴヌクレオチドからのヌクレオチド配列の少なくとも一部の増幅の開始を可能にする条件下で増幅し；そして前記増幅された核酸を検出し、それにより、デング病ウィルスを検出することを含んで成る、デング病ウィルスの検出方法である。好ましくは、前記方法はさらに、配列番号16にハイブリダイズする検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドを、デング病の核酸の増幅された核酸にハイブリダイズし；そして増幅された核酸への検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することを含んで成る。

40

【0295】

前記検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは好ましくは、配列番号24又はその相補体を含んで成る。より好ましくは、オリゴヌクレオチドは、配列番号41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54及び55から成る群から選択される。核酸は、少なくとも1つの上流プライマー及び少なくとも1つの下流プライマーにより増幅され

50

る。好ましくは、前記検出できるようラベルされたオリゴヌクレオチドは、配列番号17又はその相補体の少なくとも20個の連続したヌクレオチドを含んで成り、配列番号18又はその相補体を含んで成り、配列番号28又はその相補体を含んで成る。TaqMan（商標）及び定量アッセイに関しては、上記に言及される好ましい特徴が供給される。

【0296】

本発明のもう1つの対象は、前記方法に関して上記に言及されるようなオリゴヌクレオチドを含んで成る、デング熱ウィルスを検出するためのキットである。

【実施例】

【0297】

例1：西ナイル熱ウィルスRNAの増幅及び検出：

10

ウィルス感染された細胞培養上清液の溶解物を、Dr. R. Lanciotti of the Centers for Disease Control and Preventionから得た。核酸を、QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qia gen Inc., Valencia, CA)からの試薬を用いて、その製造業者の説明書に従って、前記溶解物から精製した。精製された核酸の一連の10倍希釈溶液 ( $10^{-2}$  ~  $10^{-7}$ ) を製造した。

【0298】

50  $\mu$ lの個々の希釈溶液を、1  $\mu$ Mのプライマー（配列番号8及び15の個々）、55mMのトリシン（pH7.7、Sigma、カタログ番号T-5816）、450  $\mu$ MのdNTP（dATP、dCTP、dGTP及びdUTPの個々、Pharmacia）、2.7mMの酢酸マンガニン（Fluka、カタログ番号63537）、135mMの酢酸カリウム（Fluka、カタログ番号60035）、7%（v/v）DMSO（Sigma、カタログ番号D8418）、6%（v/v）のグリセロール（USB、カタログ番号16347）、5単位のウラシル-N-グリコシラーゼ（Roche Diagnostics）、40単位のZ05 DNAポリメラーゼ（Roche Diagnostics）及び0.15  $\mu$ Mのプロープ（FAM及びCY5によりラベルされた配列番号28）を含む反応物100  $\mu$ l中、TaqMan（商標）試薬及びRT-PCRによる方法を用いて、5'ヌクレアーゼ反応アッセイにおいて増幅した。

20

【0299】

逆転写/PCRを、COBAS TaqMan<sup>TM</sup> Instrument (Roche Diagnostics, Pleasanton, CA)において、次の熱サイクルパラメーターを用いて行った：50 で4分 59 で30分 95 で15秒、58 で50秒（2サイクル） 91 で15秒、58 で50秒（60サイクル） 40 で2分。増幅結果の例は、図6に示される。

【0300】

30

本発明の種々の態様が記載されて来た。前記の記載及び例は本発明を制限するよりもむしろ例示する目的である。実際、修飾は本発明の種々の態様に対して行われ得るが、それらは本発明の範囲内であることは、当業者に明らかであろう。本明細書に引用される個々の引例はそのすべてを引用により本明細書に組込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0301】

【図1-1】図1-1は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプライマーにより結合され得る、フラビウシルスのゲノムの3'末翻訳領域において配列番号1として同定される保存された配列の領域を表わす。配列番号2は、配列番号1の相補体を表わす。

40

【図1-2】図1-2は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプライマーにより結合され得る、フラビウシルスのゲノムの3'末翻訳領域において配列番号1として同定される保存された配列の領域を表わす。配列番号2は、配列番号1の相補体を表わす。

【図1-3】図1-3は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプライマーにより結合され得る、フラビウシルスのゲノムの3'末翻訳領域において配列番号1として同定される保存された配列の領域を表わす。配列番号2は、配列番号1の相補体を表わす。

【図1-4】図1-4は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプライマーにより結合され得る、フラビウシルスのゲノムの3'末翻訳領域において配列番

50



号1として同定される保存された配列の領域を表わす。配列番号2は、配列番号1の相補体を表わす。

【図1-5】図1-5は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプライマーにより結合され得る、フラビウシルスのゲノムの3'末翻訳領域において配列番号1として同定される保存された配列の領域を表わす。配列番号2は、配列番号1の相補体を表わす。

【図2-1】図2-1は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプライマーにより結合され得る、フラビウシルスのゲノムの3'末翻訳領域において配列番号9として同定される保存された配列の領域を表わす。配列番号10は、配列番号9の相補体を表わす。

10

【図2-2】図2-2は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプライマーにより結合され得る、フラビウシルスのゲノムの3'末翻訳領域において配列番号9として同定される保存された配列の領域を表わす。配列番号10は、配列番号9の相補体を表わす。

【図2-3】図2-3は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプライマーにより結合され得る、フラビウシルスのゲノムの3'末翻訳領域において配列番号9として同定される保存された配列の領域を表わす。配列番号10は、配列番号9の相補体を表わす。

【図3-1】図3-1は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプロープにより結合され得る、フラビウシルスのゲノムの3'末翻訳領域において配列番号16として同定される保存された配列の領域を表わす。配列番号17は、配列番号16の相補体を表わす。配列番号16において、Nは不在であるか、A又はCである。配列番号17において、Nは不在であるか、T又はGである。

20

【図3-2】図3-2は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプロープにより結合され得る、フラビウシルスのゲノムの3'末翻訳領域において配列番号16として同定される保存された配列の領域を表わす。配列番号17は、配列番号16の相補体を表わす。配列番号16において、Nは不在であるか、A又はCである。配列番号17において、Nは不在であるか、T又はGである。

【図3-3】図3-3は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプロープにより結合され得る、フラビウシルスのゲノムの3'末翻訳領域において配列番号16として同定される保存された配列の領域を表わす。配列番号17は、配列番号16の相補体を表わす。配列番号16において、Nは不在であるか、A又はCである。配列番号17において、Nは不在であるか、T又はGである。

30

【図3-4】図3-4は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプロープにより結合され得る、フラビウシルスのゲノムの3'末翻訳領域において配列番号16として同定される保存された配列の領域を表わす。配列番号17は、配列番号16の相補体を表わす。配列番号16において、Nは不在であるか、A又はCである。配列番号17において、Nは不在であるか、T又はGである。

【図3-5】図3-5は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプロープにより結合され得る、フラビウシルスのゲノムの3'末翻訳領域において配列番号16として同定される保存された配列の領域を表わす。配列番号17は、配列番号16の相補体を表わす。配列番号16において、Nは不在であるか、A又はCである。配列番号17において、Nは不在であるか、T又はGである。

40

【図3-6】図3-6は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプロープにより結合され得る、フラビウシルスのゲノムの3'末翻訳領域において配列番号16として同定される保存された配列の領域を表わす。配列番号17は、配列番号16の相補体を表わす。配列番号16において、Nは不在であるか、A又はCである。配列番号17において、Nは不在であるか、T又はGである。

【図3-7】図3-7は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプロープにより結合され得る、フラビウシルスのゲノムの3'末翻訳領域において配列番号1

50

6として同定される保存された配列の領域を表わす。配列番号17は、配列番号16の相補体を表わす。配列番号16において、Nは不在であるか、A又はCである。配列番号17において、Nは不在であるか、T又はGである。

【図4-1】図4-1は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸と、本発明のオリゴヌクレオチドの核酸配列との一列整列を表わす。

【図4-2】図4-2は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸と、本発明のオリゴヌクレオチドの核酸配列との一列整列を表わす。

【図4-3】図4-3は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸と、本発明のオリゴヌクレオチドの核酸配列との一列整列を表わす。

【図4-4】図4-4は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸と、本発明のオリゴヌクレオチドの核酸配列との一列整列を表わす。

10

【図4-5】図4-5は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸と、本発明のオリゴヌクレオチドの核酸配列との一列整列を表わす。

【図4-6】図4-6は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーの核酸と、本発明のオリゴヌクレオチドの核酸配列との一列整列を表わす。

【図5-1】図5-1は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーでない検出できるフラビウシスの核酸配列と、本発明のオリゴヌクレオチドの核酸配列との一列整列を表わす。

【図5-2】図5-2は、日本脳炎ウィルス血清グループのメンバーでない検出できるフラビウシスの核酸配列と、本発明のオリゴヌクレオチドの核酸配列との一列整列を表わす。

20

【図6】図6は、本発明のオリゴヌクレオチドを用いて、一連の希釈され、抽出されたWNV RNAの検出を示す増幅サイクルの数に対する標準化された蛍光のプロットで表わす。

【図7-1】図7-1は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプライマーにより結合され得る、多数のSLEV単離物のゲノムの3'末翻訳領域の配列を表わす。次の単離物についての配列が示される：BFS1750 (配列番号29), 1750-Std (配列番号30), TD6-4G (配列番号31), CoaV750 (配列番号32), L695121.05 (配列番号33), TNM771K (配列番号34), MSI-7 (配列番号35), Kern217 (配列番号36), CoaV608 (配列番号37), TBH-28 (配列番号38), VR1265 (配列番号39), 及び CoaV353 (配列番号40)。

【図7-2】図7-2は、本発明の組成物及び方法を用いて検出され、そして本発明のプライマーにより結合され得る、多数のSLEV単離物のゲノムの3'末翻訳領域の配列を表わす。次の単離物についての配列が示される：BFS1750 (配列番号29), 1750-Std (配列番号30), TD6-4G (配列番号31), CoaV750 (配列番号32), L695121.05 (配列番号33), TNM771K (配列番号34), MSI-7 (配列番号35), Kern217 (配列番号36), CoaV608 (配列番号37), TBH-28 (配列番号38), VR1265 (配列番号39), 及び CoaV353 (配列番号40)。

30

【 図 1 - 2 】

SSU ID #	CHACCCAGAGAGAGCTGGTGTAACAAGACCCGCGAATGTA	TCTATGTAAAGCC	CTGAGAACCGCTCTCGAGAGACCCCACTATTTATTACTTAAGAG	GTAAAGCC	CTGAGAACCGCTCTCGAGAGACCCCACTATTTATTACTTAAGAG
AF1164635	T				
AF210908					
AF210909					
AF210910					
AF210911					
AF210912					
AF210913					
AF210914					
AF210915					
AF210916					
AF210917					
AF210918					
AF210919					
AF210920					
AF210921					
AF210922					
AF210923					
AF210924					
AF210925					
AF210926					
AF210927					
AF210928					
AF210929					
AF210930					
AF210931					
AF210932					
AF210933					
AF210934					
AF210935					
AF210936					
AF210937					
AF210938					
AF210939					
AF210940					
AF210941					
AF210942					
AF210943					
AF210944					
AF210945					
AF210946					
AF210947					
AF210948					
AF210949					
AF210950					
AF210951					
AF210952					
AF210953					
AF210954					
AF210955					
AF210956					
AF210957					
AF210958					
AF210959					
AF210960					
AF210961					
AF210962					
AF210963					
AF210964					
AF210965					
AF210966					
AF210967					
AF210968					
AF210969					
AF210970					
AF210971					
AF210972					
AF210973					
AF210974					
AF210975					
AF210976					
AF210977					
AF210978					
AF210979					
AF210980					
AF210981					
AF210982					
AF210983					
AF210984					
AF210985					
AF210986					
AF210987					
AF210988					
AF210989					
AF210990					
AF210991					
AF210992					
AF210993					
AF210994					
AF210995					
AF210996					
AF210997					
AF210998					
AF210999					
AF211000					

[illegible]

【 図 1 - 4 】

AF297849	T	T	C	A	G	G	G
AF297850	T	T	A	A	G	G	G
AF297851	T	T	C	GTA	G	G	G
AF297852	T	T	C	A	G	G	G
AF297853	T	T	C	A	G	G	G
AF297854	T	T	C	A	G	G	G
AF297855	T	T	A	A	G	G	G
AF297856	T	T	G	A	G	G	G
AF297857	T	T	CCT	GA	G	G	G
AF297858	T	T	A	A	G	G	G
AF297859	T	T	A	A	G	G	G
AF297860	T	T	GA	A	G	G	G
AF297861	T	T	C	A	G	G	G
AF297862	T	T	A	A	G	G	G
AF297863	T	T	A	A	G	G	G
AF297864	T	T	A	A	G	G	G
AF297865	T	T	A	A	G	G	G
AF297866	T	T	A	A	G	G	G
AF297867	T	T	A	A	G	G	G
AF297868	T	T	A	A	G	G	G
AF297869	T	T	A	A	G	G	G
AF297870	T	T	A	A	G	G	G
AF297871	T	T	A	A	G	G	G
AF297872	T	T	A	A	G	G	G
AF297873	T	T	A	A	G	G	G
AF297874	T	T	A	A	G	G	G
AF297875	T	T	A	A	G	G	G
AF297876	T	T	A	A	G	G	G
AF297877	T	T	A	A	G	G	G
AF297878	T	T	A	A	G	G	G
AF297879	T	T	A	A	G	G	G
AF297880	T	T	A	A	G	G	G
AF297881	T	T	A	A	G	G	G
AF297882	T	T	A	A	G	G	G
AF297883	T	T	A	A	G	G	G
AF297884	T	T	A	A	G	G	G
AF297885	T	T	A	A	G	G	G
AF297886	T	T	A	A	G	G	G
AF297887	T	T	A	A	G	G	G
AF297888	T	T	A	A	G	G	G
AF297889	T	T	A	A	G	G	G
AF297890	T	T	A	A	G	G	G
AF297891	T	T	A	A	G	G	G
AF297892	T	T	A	A	G	G	G
AF297893	T	T	A	A	G	G	G
AF297894	T	T	A	A	G	G	G
AF297895	T	T	A	A	G	G	G
AF297896	T	T	A	A	G	G	G
AF297897	T	T	A	A	G	G	G
AF297898	T	T	A	A	G	G	G
AF297899	T	T	A	A	G	G	G
AF297900	T	T	A	A	G	G	G
AF297901	T	T	A	A	G	G	G
AF297902	T	T	A	A	G	G	G
AF297903	T	T	A	A	G	G	G
AF297904	T	T	A	A	G	G	G
AF297905	T	T	A	A	G	G	G
AF297906	T	T	A	A	G	G	G
AF297907	T	T	A	A	G	G	G
AF297908	T	T	A	A	G	G	G
AF297909	T	T	A	A	G	G	G
AF297910	T	T	A	A	G	G	G
AF297911	T	T	A	A	G	G	G
AF297912	T	T	A	A	G	G	G
AF297913	T	T	A	A	G	G	G
AF297914	T	T	A	A	G	G	G
AF297915	T	T	A	A	G	G	G
AF297916	T	T	A	A	G	G	G
AF297917	T	T	A	A	G	G	G
AF297918	T	T	A	A	G	G	G
AF297919	T	T	A	A	G	G	G
AF297920	T	T	A	A	G	G	G
AF297921	T	T	A	A	G	G	G
AF297922	T	T	A	A	G	G	G
AF297923	T	T	A	A	G	G	G
AF297924	T	T	A	A	G	G	G
AF297925	T	T	A	A	G	G	G
AF297926	T	T	A	A	G	G	G
AF297927	T	T	A				

MS5596	.GT.		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
MS5597	.GT.		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
D80194	.GT.		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF311748	.GT.		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF092950	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF092952	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF092953	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF149511	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF149590	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF148901	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF148902	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF218068	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF218069	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF218231	.GTT		T	T	A.C.	CG	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
L48967	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF184212	.GT.		T	T	A.C.	CG	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF279856	.GTT		T	T	A.C.	CG	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF161617	.GTT		T	T	A.C.	CG	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
L54067	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
L54068	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
L54070	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
L54071	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
L54122	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
L54123	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF306515	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF306516	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
AF306517	.GTT		T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
SL5V			T	T	A.C.	CA	AGTGA	A		T	T	TG	TACC	G	G	G	
MS1708	.TGG		T	T	A.C.	CGGGAT	GCA		C	TT	A	G	GTTC	TGACATG	CTGAGAG	C	
TG5-4G	.TGG		T	T	A.C.	CGGGAT	GCA		C	TT	A	G	GTTC	TGACATG	CTGAGAG	C	
TG5-4G-20	.TGG		T	T	A.C.	CGGGAT	GCA		C	TT	A	G	GTTC	TGACATG	CTGAGAG	C	
TG5-4G-20	.TGG		T	T	A.C.	CGGGAT	GCA		C	G	TT	AT	G	GTTC	TGACATG	CTGAGAG	C
CoatV50	.TGG		T	T	A.C.	CGGGAT	GCA		C	G	TT	AT	G	GTTC	TGACATG	CTGAGAG	C



【 図 3 - 1 】

**FIGURE 3<sup>rd</sup>**

[illegible]

【 図 3 - 3 】

[illegible]

【図 3 - 2】

[illegible]

【図 3 - 4】

[illegible]

【 図 3 - 6 】

[illegible][illegible]

【 図 4 - 1 】

[illegible]

配列番号28及び70についての2種の可能性ある部位がこの領域に見出され得る。それらは、配列番号28について一本の下線により、及び配列番号70について濃淡形により示される。

**FIGURE 4**

XY1129	5'-GTAA GCC CTCAGAA CCGCTCTCGAA-3'
NNV	
AF317203	
AF196835	
AF260967	
AF260968	
AF260969	
AF481864	
AF206514	
AF317203	
AF202541	
AF404757	
AF404753	
AF404754	
AF196540	
AF404756	
AF017254	
L48977	
AF196536	
AF196537	
AF196538	
AF196540	
AF196541	
AF196542	
AF196543	
AF458343	G
AF458344	
AF458347	
AF458348	
AF458350	
AF458352	C
AF458353	
AF458355	
AF458358	
AF458360	
AF458361	
AF206977	
AF196539	
AF196535	
AF458359	
AF458357	
AF458354	
AF458349	
AF458345	
AF458346	T
AF533540	T

## 【図 4 - 2】

<u>JEV</u>	
AB051292	.A.....
AF014160	.A.....
AF014161	.A.....
AF045551	.A.....
AF069076	.A.....
AF075723	.A.....G.....
AF080251	.A.....
AF098735	.A.....
AF098736	.A.....
AF098737	.A.....
AF217620	.A.....
AF221499	.A.....
AF221500	.A.....
AF254452	.A.....
AF254453	.A.....
AF315119	.A.....T.....
AF416457	.A.....
AF486638	.A.....
U14163	.A.....
U15763	.A.....
KY1129 5'-GTAAGCC CTCAGAACCGTCTCGGAA-3'	
<u>JEV 続</u>	
L48961	.A.....
U47032	.A.....
M18370	.A.....
M55506	.A.....
L78128	.A.....
D90195	.A.....
D90194	.A.....
AF311748	.A.....
AF092550	.A.....
AF092552	.A.....
AF092553	.A.....
AF139531	.A.....
AF148900	.A.....
AF148902	.A.....
AF218068	.A.....
AF289816	.A.....
AF318291	.A.....
L48967	.A.....
L48968	.A.....C.....
L54067	.A.....
L54068	.A.....
L54069	.A.....
L54070	.A.....
L54071	.A.....
L54072	.A.....
L54122	.A.....
L54123	.A.....
AF306514	.A.....
AF306515	.A.....T.....

## 【図 4 - 3】

AF306516	.A.....T.....
AF306517	.A.....A.....T.....
<u>MVEV</u>	
AF161266	.A.....T.C.....
M35172	.A.....T.C.....
L48972	.A.....T.C.....
L48973	.A.....T.C.....
L48974	.A.....T.C.....C.....
L48975	.A.....T.C.....
L48976	.A.....T.C.....T.....
<u>KUNJIN</u>	
AF458351	.....G.....
AF458356	.....C.....
AF297840	.....C.....
AF297841	.....
AF297842	.....
AF297843	.....
AF297844	.....
AF297845	.....
AF297846	.....C.....
AF297847	.....C.....
AF297848	.....
AF297849	.....
AF297850	.....C.....
AF297851	.....C.....GT
AF297852	.....C.....
AF297853	.....C.....
AF297854	.....
AF297855	.....
AF297856	.....
AF297857	.....G.....
AF297858	.....
AF297859	.....
L48978	.....
L49311	.....
D00246	.....
L48979	.....
L24512	.....
<u>KOUTANGO</u>	
L48980	.....
KY1130 5'-TCCTAGTCTA TCCGAGGTCTCA-3'	
<u>WNV</u>	
AF196835	.....
AF260967	.....
AF260968	.....
AF260969	.....

## 【図 4 - 4】

AF481864	.....
M12294	C.....
AF206518	.....
AF317203	.....
AF202541	.....
AF404757	.....
AF404753	.....
AF404754	.....
AF404755	.....
AF404756	.....
AF017254	.....A.....
L24512	.....
<u>JEV</u>	
AB051292	...C.....T.....
AF014160	...C.....T.....
AF014161	...C.....T.....
AF045551	...C.....T.....
AF069076	...C.....T.....
AF075723	...C.....T.....
AF080251	...C.....T.....
AF098735	...C.....T.....
AF098736	...C.....T.....
AF098737	...G.....TCT.....
AF217620	...C.....T.....
AF221499	...C.....T.....
AF221500	...C.....T.....
AF254452	...C.....T.....
AF254453	...C.....T.....
AF315119	...C.....T.....
AF416457	...C.....T.....
AF486638	...C.....A.....T.....
U14163	...C.....T.....
U15763	...C.....T.....
L48961	...C.....T.....
U47032	...C.....T.....
M18370	...C.....T.....
M55506	...C.....T.....
L78128	...C.....T.....
D90195	...C.....T.....
D90194	...C.....T.....
AF311748	...C.....T.....
AF306514	...C.....C.....T.....
AF306515	...C.....C.....T.....
AF306516	...C.....C.....T.....
AF306517	...C.....C.....T.....
D00037	...C.....T.....
M14933	...C.....T.....
<u>MVEV</u>	
AF161266	.....TT.....
M35172	.....TT.....

## 【図 4 - 5】

KY1131 5'-GGACTAGAGTTAGAGGAGACCCCGCG-3'	
<u>WNV</u>	
AF196835	.....
AF260967	.....
AF260968	.....
AF260969	.....
AF481864	.....
M12294	.....T.....
AF206518	.....
AF317203	.....
AF202541	.....
AF404757	.....
AF404753	.....
AF404754	.....
AF404755	.....
AF404756	.....
AF017254	.....
AF208017	.....T.....A.....T.....
L24512	.....T.....
<u>JEV</u>	
AB051292	.....T.....
AF014160	.....T.....
AF014161	.....T.....
AF045551	.....T.....
AF069076	.....T.....
AF075723	.....T.....
AF080251	.....T.....
AF098735	.....T.....
AF098736	.....T.....
AF098737	.....T.....
AF217620	.....T.....
AF221499	.....T.....
AF221500	.....T.....
AF254452	.....T.....
AF254453	.....T.....
AF315119	.....T.....
AF416457	.....T.....
AF486638	.....T.....
U14163	.....T.....
U15763	.....T.....
L48961	.....T.....
L24512	.....T.....
U47032	.....T.....
M18370	.....T.....
M55506	.....T.....
L78128	.....T.....
D90195	.....T.....
D90194	.....T.....
AF311748	.....T.....
AF306514	.....T.....
AF306515	.....T.....

## 【図 4 - 6】

AF306516 .....T..  
AF306517 .....T..  
MVEV  
AF161266 .....A.TC  
M35172 .....A.TC

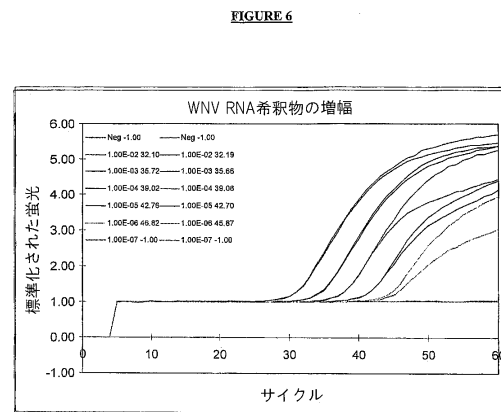
## 【図 5 - 1】

**FIGURE 5**  
KY1131 5'-GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGCGG-3'  
DENGUE  
AF226685 .....C..C  
AF311956 .....C..C  
AF311957 .....C..C  
AF311958 .....C..C  
AY145121 .....C..C  
AY145122 .....C..C  
AF514878 .....C..C  
AF514885 .....C..C  
AF514889 .....C..C  
AF489932 .....C..CA  
AF226687 .....C..C  
AX224213 .....C..C  
AX224215 .....C..C  
AX224217 .....C..C  
AX224219 .....C..C  
AX224225 .....C..C  
AX224227 .....C..C  
AX224233 .....C..C  
AB074760 .....C..C  
AB074761 .....C..C  
A75711 .....CG..C  
AX224221 .....C..C  
AX224223 .....C..C  
U87412 .....C..C  
U61246 .....C..C  
U61247 .....C..C  
AF100465 .....C..CA  
AF100466 .....C..CA  
AX224209 .....C..C  
AF180818 .....C..C  
AF326573 .....C..CA  
AF350498 .....C..C  
AF359579 .....C..C  
AY037116 .....C..C  
AF309950 .....C..C  
AF309953 .....C..CA  
AF309954 .....C..CA  
AF309959 .....C..CA  
AF309962 .....C..C  
AF309963 .....C..C  
AF309964 .....C..C  
AF309965 .....C..CA  
AF289029 .....C..CA  
AF208496 .....C..CA  
AF310146 .....C..C  
AF310149 .....C..C  
AF310153 .....C..CA  
AF226686 .....C..C  
AF276619 .....C..C

## 【図 5 - 2】

AF169678 .....C..C  
AF169679 .....C..C  
AF169680 .....C..C  
AF169681 .....C..C  
AF169682 .....C..C  
AF169683 .....C..C  
AF169684 .....C..C  
AF169685 .....C..C  
AF169686 .....C..C  
AF169687 .....C..C  
AF169688 .....C..C  
AF100145 .....C..CA  
AF100467 .....T..CC  
AF100468 .....T..CC  
AF100149 .....T..CC  
M20558 .....C..CA  
M29095 .....C..CA  
M19197 .....C..CA  
M14931 .....C..CA  
U87411 .....C..C  
U88536 .....C..C  
  
KY1131 5'-GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGCGG-3'  
デング熱  
U88537 .....C..C  
AF038403 .....C..CA  
AF326826 .....C..CA  
AF326827 .....C..CA  
  
モンタナ筋炎白質脳炎ウイルス  
NC\_004119 .....TTCC  
  
モドックウイルス  
NC\_003635 .....CG..C  
  
黄熱病ウイルス  
X03700 .....TC..A.  
U52393 .....TC..A.  
U52407 .....TC..A.  
AF052448 .....TC..A.

## 【図 6】





【圖 7 - 2】

[illegible][illegible]

0004782668000001 . app

## フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/555,530

(32)優先日 平成16年3月22日(2004.3.22)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 ヤング, カレン クウォク イン

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94583, サン ラモン, ブルンスウィック コート 9943

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 Am. J. Med. Hyg., 2001年, vol.65, no.6, pp.747-753

J. Clin. Microbiol., 2000年, vol.38, no.11, pp.4066-4071

J. Clin. Microbiol., 2001年, vol.39, no.12, pp.4506-4513

Virology, 1996年, vol.218, no.2, pp.417-421

臨床とウイルス, 1990年, vol.18, no.3, pp.322-325

Am. J. Med. Hyg., 1999年, vol.61, no.4, pp.677-680

RNA, 2001年, vol.7, no.10, pp.1370-1377

J. Am. Mosq. Control. Assoc., 2002年, vol.18, no.1, pp.26-31

Microbiol. Immunol., 1997年, vol.41, no.3, pp.209-213

Am. J. Med. Hyg., 1997年, vol.56, no.4, pp.424-429

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00-15/90

C12Q 1/68

C12Q 1/70

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed