

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-542361

(P2022-542361A)

(43)公表日 令和4年10月3日(2022.10.3)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z Z N A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/689(2018.01)	C 1 2 Q 1/689	Z
C 1 2 Q 1/6851(2018.01)	C 1 2 Q 1/6851	Z
C 1 2 Q 1/6869(2018.01)	C 1 2 Q 1/6869	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全26頁)

(21)出願番号 特願2022-504572(P2022-504572)	(71)出願人 516079660
(86)(22)出願日 令和2年7月24日(2020.7.24)	タリス バイオメディカル コーポレイシ ョン
(85)翻訳文提出日 令和4年3月10日(2022.3.10)	アメリカ合衆国 9 4 0 2 5 カリフォル ニア州 メンロ パーク コンスティチュ ーション ドライブ 2 3 0
(86)国際出願番号 PCT/US2020/043620	
(87)国際公開番号 WO2021/016602	(74)代理人 100102978
(87)国際公開日 令和3年1月28日(2021.1.28)	弁理士 清水 初志
(31)優先権主張番号 16/719,744	(74)代理人 100102118
(32)優先日 令和1年12月18日(2019.12.18)	弁理士 春名 雅夫
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	(74)代理人 100160923
(31)優先権主張番号 62/878,639	(74)代理人 100160923
(32)優先日 令和1年7月25日(2019.7.25)	弁理士 山口 裕孝
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	(74)代理人 100119507
(31)優先権主張番号 16/523,609	弁理士 刑部 俊
最終頁に続く	(74)代理人 100142929
	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ナイセリア・ゴノレアの増幅と検出のためのポリヌクレオチド

(57)【要約】

本明細書では、例えば、試験試料に存在するナイセリア・ゴノレア核酸を増幅しかつ前記核酸の存在を判定するための、核酸増幅試験(N A A T)によるN・ゴノレアの検出に関するプライマー及びプローブを開示している。具体的には、本開示は、ループ介在等温増幅(L A M P)及び分子ビーコンハイブリダイゼーションによる検出のための、N・ゴノレアのシトクロムCまたはc c p A遺伝子に結合するプライマー及びプローブを記載している。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

セット - 1 ~ セット - 15 からなる群から選択される配列特異的プライマーセットを含む、組成物。

## 【請求項 2】

前記配列特異的プライマーセットが、セット - 5、セット - 11、セット - 13、セット - 14、及びセット - 15 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

前記配列特異的プライマーセットがセット - 15 である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

プローブをさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 5】

前記プローブが標識を含む、請求項 4 に記載の組成物。

## 【請求項 6】

前記プローブが、標識されたポリヌクレオチドである、請求項 5 に記載の組成物。

## 【請求項 7】

前記標識されたポリヌクレオチドが、配列番号 73 のヌクレオチド 6 ~ 22、配列番号 74 のヌクレオチド 5 ~ 24、配列番号 75 のヌクレオチド 3 ~ 21、及び配列番号 76 のヌクレオチド 3 ~ 24 からなる群から選択される配列を含む、請求項 6 に記載の組成物。

## 【請求項 8】

前記標識されたポリヌクレオチドが、配列番号 73 ~ 配列番号 76 からなる群から選択される配列を含む、請求項 6 に記載の組成物。

## 【請求項 9】

前記標識がフルオロフォアである、請求項 6 に記載の組成物。

## 【請求項 10】

前記フルオロフォアが、前記ポリヌクレオチドの末端に共有結合している、請求項 9 に記載の組成物。

## 【請求項 11】

前記プローブが、フルオロフォアとクエンチャーとポリヌクレオチドとを含む分子ビーコンである、請求項 4 に記載の組成物。

## 【請求項 12】

前記分子ビーコンが、配列番号 73 ~ 配列番号 76 からなる群から選択される配列を含む、請求項 11 に記載の組成物。

## 【請求項 13】

ポリヌクレオチド配列が配列番号 75 からなる、請求項 12 に記載の組成物。

## 【請求項 14】

以下を含む、試験試料中のナイセリア・ゴノレア (*Neisseria gonorrhoeae*) を検出する方法：

前記試験試料から核酸を抽出すること；

ステップ (a) で抽出した核酸を、鎖置換 DNA ポリメラーゼと配列特異的プライマーセットとを含む反応混合物と反応させることによって、標的配列を増幅することであって、前記配列特異的プライマーセットが、セット - 1 ~ セット - 15 からなる群から選択される、前記増幅すること；及び

ステップ (b) の増幅産物の有無を検出することであって、前記増幅産物の存在が、前記試験試料中のナイセリア・ゴノレアの存在を示す、前記検出すること。

## 【請求項 15】

増幅ステップが 15 分未満の間行われる、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

増幅ステップが 10 分未満の間行われる、請求項 14 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 17】

前記反応混合物が逆転写酵素をさらに含む、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記増幅産物の有無を検出することが、前記増幅産物を、標識に結合しているポリヌクレオチドを含むプローブとハイブリダイズさせることを含む、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 19】

標識された前記ポリヌクレオチドが、配列番号 73 のヌクレオチド 6 ~ 22、配列番号 74 のヌクレオチド 5 ~ 24、配列番号 75 のヌクレオチド 3 ~ 21、及び配列番号 76 のヌクレオチド 3 ~ 24 からなる群から選択される配列を含む、請求項 18 に記載の方法。

10

## 【請求項 20】

標識された前記ポリヌクレオチドが、配列番号 73 ~ 配列番号 76 からなる群から選択される配列を含む、請求項 19 に記載の方法。

## 【請求項 21】

前記配列特異的プライマーセットが、セット - 5、セット - 11、セット - 13、セット - 14、及びセット - 15 からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 22】

前記配列特異的プライマーセットがセット - 15 である、請求項 21 に記載の方法。

## 【請求項 23】

ナイセリア・ゴノレ아가、100 CFU / mL の濃度で前記試験試料に存在する、請求項 14 に記載の方法。

20

## 【請求項 24】

ナイセリア・ゴノレ아가、10 CFU / mL の濃度で試験試料に存在する、請求項 23 に記載の方法。

## 【請求項 25】

ナイセリア・ゴノレ아가、10 CFU / mL の濃度で前記試験試料に存在し、かつ、増幅反応が 15 分未満の間行われる、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 26】

請求項 1 に記載の組成物を含む、キット。

## 【請求項 27】

鎖置換ポリメラーゼをさらに含む、請求項 26 に記載のキット。

30

## 【請求項 28】

逆転写酵素をさらに含む、請求項 27 に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願の相互参照

本出願は、2019年7月25日に提出した米国仮出願第 62 / 878 , 639 号の利益を主張する 2019年7月26日に提出した米国特許出願第 16 / 523 , 609 号の継続出願である 2019年12月18日に提出した米国特許出願第 16 / 719 , 744 号の一部継続出願であり、これら出願の全内容を、参照により、本明細書で援用する。

40

## 【0002】

## 配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出をした配列表を含んでおり、そして、その全内容を、本明細書で援用する。2020年7月23日に作成した当該 ASCII コピーには、TSM - 052WO\_\_SL . txt の名称を付しており、そして、17 , 533 バイトの大きさである。

## 【0003】

## 発明の分野

本発明は、分子生物学、及び核酸化学の分野に関する。本発明は、ナイセリア・ゴノレ

50

ア (*Neisseria gonorrhoeae*) などの病原体を検出するための方法と試薬を提供しており、したがって、医学的診断及び予測の分野にも関連する。特に、本発明は、ナイセリア・ゴノレアを増幅及び検出するためのポリヌクレオチドと方法に関する。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

淋病の原因菌であるナイセリア・ゴノレアは、尿生殖路に感染し、淋病の臨床徴候は、その他の性感染症 (STD) の徴候と重複することが多い。感染症は、女性の場合には無症候性であることが多く、治療をせずに放置しておく、骨盤内炎症性疾患 (PID)、慢性骨盤痛、卵管性不妊症、及び生命に危険が及ぶ子宮外妊娠など、より深刻で、永続的に健康に影響を及ぼす合併症を引き起こしかねない。男性では、大抵の尿道感染症では尿道炎が認められており、治療をせずに放置しておく、結果として、不妊症を招く精巣上体炎に至る。さほど一般的ではないが、男性の無症候性感感染率も重要である。新生児の結膜炎は、失明を引き起こしかねない。3つのいずれのグループでも、N・ゴノレア (*N. gonorrhoeae*) を治療せずに放置しておく、関節炎、髄膜炎、または心内膜炎に関連した急性皮膚炎、腱滑膜炎症候群、及び敗血症の発症に至ってしまう。

【0005】

N・ゴノレアの世界的影响は、毎年1億600万件という新規症例の推定値から見て取れる。世界的にみて、N・ゴノレアは、2番目に蔓延している細菌性の性感染症であり、そして、米国では届出義務が定められた伝染病であり、その届出頻度は2番目に大きい。WHOは、N・ゴノレア感染の発生率は、1995年以降着実に増加しており、2005年~2008年にかけて11.7%増加したと推定している。N・ゴノレアは、抗生物質耐性プロファイルに関連する喫緊の公衆衛生上の脅威として分類されており、また、30%の菌株が1つ以上の治療抗生物質に対して耐性を有していると推定されており、このことが、臨床的問題を難しくしており、また発生率を押し上げている。

【0006】

感染症の予防と抑制における主要な公衆衛生戦略の1つは、スクリーニング、迅速な同定、及び効果的な治療を通じて、ヒトの間での感染を抑制することにある。この戦略には、特異的で、かつ感度の高い診断が必須である。

【0007】

感度、特異性による測定を行い、かつ検体輸送が簡便である核酸増幅試験 (NAAT) の性能は、淋病性感感染症の診断に関して現在利用可能なその他の試験診断の性能を上回っている。The US Centers for Disease Control (CDC) は、若干の限られた例外を除いて、淋病の検出には、臨床研究室及び疾病管理研究所でのNAATの使用を特に推奨している。クラミジア・トラコマティス (*Chlamydia trachomatis*) 及びナイセリア・ゴノレアの実験室ベースでの検出に関する推奨事項 - 2014. MMWR 2014; 63 (No. RR-2)。感度と特異性とを関連づけて、侵襲性がさらに小さな検体収集の用途に向けてこれらのアッセイを提供しており、感染症のスクリーニングをさらに容易にした。NAATに最適な推奨検体タイプとして、男性の尿と、女性の膣スワブがまず挙げられる。

【0008】

FDAが承認したNAATとして、Abbott RealTime CT/NG (Abbott m2000システムプラットフォーム)、Aptima COMBOまたは個別のCTまたはGCアッセイ (Hologic Pantherシステムプラットフォーム)、BD ProbeTecアッセイ (ET CT/GC増幅DNAアッセイ、及びQx CTまたはGC増幅DNAアッセイ、及びBD Viperシステムプラットフォーム)、Cepheid Xpert CT/NGアッセイ (GeneXpert IVポイント・オブ・ケア装置)、及びRoche Diagnostics CT/NGテスト (cobas 4800システムプラットフォーム) がある。Abbott、Apt

10

20

30

40

50

i m a、B D、及びR o c h eのアッセイは、すべて、試料調製、標的増幅、及び検出の自動化を実現している。このことは、試料調製と手間が省ける点では有利であるが、それぞれのシステムプラットフォームには、設備投資が膨大になりかねず、また、診断結果を得るまでに少なくとも3時間を要する。C e p h e i dアッセイと、それに付随する装置は、唯一のポイント・オブ・ケア機器であり、コストを削減し、空間フィンガープリントを備えているが、診断結果を得るまでに約90分間要する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、高感度である、応答時間を大幅な短縮する、機器コストを削減する、そして、利用の意向に応じて試料を提供する、ポイント・オブ・ケア装置と互換可能な新規のアッセイが、必要とされている。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

概要

一部の実施形態では、本明細書では、セット - 1 ~ セット - 27 からなる群から選択選択されるポリヌクレオチドのセットを含む組成物を提供する。一部の実施形態では、組成物は、プローブをさらに含む。一部の実施形態では、プローブは、標識を含む。一部の実施形態では、プローブは、標識されたポリヌクレオチドである。

【0011】

20

一部の実施形態では、プローブは、配列番号73 ~ 76 からなる群から選択される配列を有する標識されたポリヌクレオチドであり、かつ、ポリヌクレオチドのセットは、セット12 ~ 15 から選択される。

【0012】

一部の実施形態では、標識は、フルオロフォアである。一部の実施形態では、フルオロフォアは、ポリヌクレオチドの末端に共有結合している。一部の実施形態では、プローブは、クエンチャーを含む分子ビーコンである。一部の実施形態では、フルオロフォアは、F A M であり、かつクエンチャーは、B H Q 1 である。その他の実施形態では、フルオロフォアは、A T T O 565 または A l e x a 594 であり、かつクエンチャーは、B H Q 1 または B H Q 2 である。

30

【0013】

本明細書では、フルオロフォアとクエンチャーとポリヌクレオチドとを含む分子ビーコンも提供しており、当該ポリヌクレオチドは、配列番号73 ~ 76 からなる群から選択され、かつ当該ポリヌクレオチドのセットは、セット12 ~ 15 から選択される。一部の実施形態では、フルオロフォアはF A M であり、かつクエンチャーはB H Q 1 である。その他の実施形態では、フルオロフォアは、A T T O 565 または A l e x a 594 であり、かつクエンチャーは、B H Q 1 または B H Q 2 である。

【0014】

本明細書では、試験試料中のナイセリア・ゴノレアを検出する方法も提供しており、この方法は、( a ) 当該試験試料から核酸を抽出すること；( b ) ステップ ( a ) で抽出した核酸を、鎖置換D N A ポリメラーゼと配列特異的プライマーセットとを含む反応混合物と反応させることによって、標的配列を増幅することであって、当該配列特異的プライマーセットが、セット - 1 ~ セット - 27 からなる群から選択される、増幅すること；及び、( c ) ステップ ( b ) の増幅産物の有無を検出することであって、当該増幅産物の存在が、当該試験試料中のナイセリア・ゴノレアの存在を示す、検出することを含む。

40

【0015】

試験試料中のナイセリア・ゴノレアを検出する方法の一部の実施形態では、ステップ ( b ) での標的配列の増幅は、約60 ° C ~ 67 ° C の間で、30分未満の間行われる。一部の実施形態では、増幅ステップは、15分未満の間行われる。一部の実施形態では、増幅ステップは、10分未満の間行われる。

50

## 【 0 0 1 6 】

試験試料中のナイセリア・ゴノレアを検出する方法の一部の実施形態では、増幅産物の有無を検出することは、増幅産物を、標識に結合しているポリヌクレオチドを含むプローブとハイブリダイズさせることを含む。

## 【 0 0 1 7 】

試験試料中のナイセリア・ゴノレアを検出する方法の一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 73 ~ 76 からなる群から選択される配列を含み、配列特異的プライマーセットは、セット 12 ~ 15 から選択される。

## 【 0 0 1 8 】

試験試料中のナイセリア・ゴノレアを検出する方法の一部の実施形態では、プローブは、分子ビーコンである。一部の実施形態では、反応混合物は、逆転写酵素をさらに含む。一部の実施形態では、ナイセリア・ゴノレアは、100 CFU / mL の濃度で試験試料に存在する。一部の実施形態では、ナイセリア・ゴノレアは、10 CFU / mL の濃度で試験試料に存在する。

10

## 【 0 0 1 9 】

また、本発明の一部の実施形態によれば、本明細書では、セット - 1 ~ セット - 27 からなる群から選択されるポリヌクレオチドのセットと、増幅試薬とを含む組成物を含むキットを提供する。一部の実施形態では、増幅試薬は、鎖置換ポリメラーゼを含む。一部の実施形態では、キットは、プローブをさらに含む。

## 【 0 0 2 0 】

また、本明細書では、試験試料中のナイセリア・ゴノレアを検出する方法を提供しており、この方法は、(a) 当該試験試料から核酸を抽出すること；(b) ステップ (a) で抽出した核酸を、鎖置換 DNA ポリメラーゼと配列特異的 LAMP プライマーセットとを含む反応混合物と 20 分未満の間反応させることによって、標的配列を増幅すること；及び、(c) ステップ (b) の増幅産物の有無を検出することであって、当該増幅産物の存在が、当該試験試料中のナイセリア・ゴノレアの存在を示す、検出することを含む。

20

## 【 0 0 2 1 】

この方法の一部の実施形態では、核酸は、15 分未満の間、反応混合物と反応する。この方法の一部の実施形態では、標的配列は、ナイセリア・ゴノレアのシトクロム C ペルオキシダーゼ (ccpA) 遺伝子に位置する。

30

## 【 0 0 2 2 】

この方法の一部の実施形態では、ナイセリア・ゴノレアは、100 CFU / mL の濃度で試験試料に存在する。この方法の一部の実施形態では、ナイセリア・ゴノレアは、10 CFU / mL の濃度で試験試料に存在する。

## 【 0 0 2 3 】

この方法の一部の実施形態では、試験試料は、ナイセリア・ゴノレアに加えて、1 つ以上のその他の微生物を含んでおり、そして、ナイセリア・ゴノレア由来の標的配列を、1 つ以上のその他の微生物に由来するポリヌクレオチド配列よりも優先的に増幅する。

## 【 0 0 2 4 】

一部の実施形態では、本発明は、配列番号 1 ~ 76 に対して、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、少なくとも 99.1 %、少なくとも 99.2 %、少なくとも 99.3 %、少なくとも 99.4 %、少なくとも 99.5 %、少なくとも 99.6 %、少なくとも 99.7 %、少なくとも 99.8 %、または少なくとも 99.9 % が同一である核酸配列、及び、これらの核酸を使用して、試験試料中のナイセリア・ゴノレアを検出する方法を提供する。

40

## 【 発明を実施するための形態 】

## 【 0 0 2 5 】

詳細な説明

低濃度の種 (試料に含まれる数個の分子または微生物まで) の検出は、医学における課題である。本発明は、ナイセリア・ゴノレアの選択的検出に関する。特に、核酸増幅、と

50

りわけ、RT-LAMPを用いる新しい検出戦略及び分子ビーコン検出に基づいて、N.ゴノレア感染症は、本明細書に記載の方法及び試薬を使用して診断することができる。標的領域としてRNA（リボソームRNA（rRNA）、またはメッセンジャーRNAのいずれか）を使用すると、N.ゴノレアゲノム毎の標的の複数のコピーが提供される。したがって、これにより、ゲノム毎の複数のコピーが存在する場合であっても、ゲノムDNAを標的とする手法と比較して、本明細書に記載した手法を用いる試料中のN.ゴノレアの検出が容易になる。加えて、本明細書に記載した分子ビーコン検出試薬は、さらなる特異性を提供し、大抵の場合、オフターゲット増幅DNAに結合することができず、それにより、例えば、偽陽性の出現を最小限に抑える。この特異性は、とりわけ、以下に提供する実施例3（表4及び5）に示している。本発明のその他の数多くの特徴も、本明細書に記載している。 10

#### 【0026】

本明細書で使用する「核酸」は、非標準ヌクレオチドを含有するDNA及びRNAを含むDNA及びRNAの両方を含む。「核酸」は、少なくとも1つのポリヌクレオチド（「核酸鎖」）を含有する。「核酸」は、一本鎖または二本鎖とし得る。用語「核酸」は、例えば、デオキシリボ核酸（DNA）巨大分子、及びリボ核酸（RNA）巨大分子を構成するヌクレオチド及びヌクレオシドのことを指す。最も一般的な核酸は、デオキシリボ核酸（DNA）及びリボ核酸（RNA）である。本発明が、特に、ペプチド核酸（PNA）、モルホリノ、ロック核酸（LNA）、グリコール核酸（GNA）、及びスレオース核酸（TNA）などの人工ヌクレオチドを含有する生物学的配列に使用することができる、ことをさらに理解されたい。好ましくは、人工ヌクレオチドは、[アルファ]-L-LNAなどのロック核酸分子である。LNAは、リボ核酸類似体を含んでおり、その類似体では、リボース環が、少なくとも1つのLNAモノマーを含有する2'-酸素及び4'-炭素間のメチレンブリッジ、すなわち、オリゴヌクレオチド、つまり、1つの2'-O, 4'-C-メチレン-D-リボフラノシルヌクレオチドによって「ロック」されている。LNA塩基は、標準的なワトソン-クリック塩基対を形成するが、ロックした構成によって、塩基対反応の速度及び安定性が向上する（Jepsen et al., *Oligonucleotides*, 14, 130-146 (2004)）。 20

#### 【0027】

本明細書で使用する「ポリヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、及び/またはそれらの類似体、例えば、修飾主鎖（例えば、ペプチド核酸（PNA）またはホスホロチオエート）または修飾塩基を含有する2つ以上のヌクレオチドを含むポリマー鎖のことを指す。「ポリヌクレオチド」は、プライマー、オリゴヌクレオチド、核酸鎖などを含む。ポリヌクレオチドは、標準または非標準ヌクレオチドを含有し得る。したがって、この用語は、mRNA、tRNA、rRNA、リボザイム、DNA、cDNA、組換え核酸、分岐核酸、プラスミド、ベクター、プローブ、プライマーなどを含む。一般的に、ポリヌクレオチドは、鎖の一端（「5'末端」）に5'リン酸を含有しており、他端（「3'末端」）に3'ヒドロキシル基を含有する。ポリヌクレオチドの大抵の5'ヌクレオチドは、本明細書では、ポリヌクレオチドの「5'末端ヌクレオチド」と称し得る。ポリヌクレオチドの大抵の3'ヌクレオチドは、本明細書では、ポリヌクレオチドの「3'末端ヌクレオチド」と称し得る。本発明の核酸は、RNAの形態をとる場合、5'キヤップの有無は関係し得ない。 30 40

#### 【0028】

LAMPは、Bst DNAポリメラーゼ、または別の鎖置換ポリメラーゼを使って行う自動サイクル鎖置換DNA合成に依存した核酸増幅法である。増幅産物は、標的の幾つかの反復配列と複数のループを有するステムループ構造である。この方法の主な利点は、DNAテンプレートの変性が不要なので、LAMP反応が（60～67°Cの範囲の）等温条件下で実施できることにある。LAMPは、標的配列内の6つの異なるハイブリダイゼーション部位を認識する1つの酵素と、4種のプライマーだけを必要とする。2つのさらなるプライマーを加えることで、反応を促すことができる。この方法は、大量の増幅産 50

物を生成し、その結果、反応混合物の濁度または蛍光を視覚的に判断することによる検出などのより容易な検出を可能にする。

【0029】

簡潔に説明すると、反応は、一对の『ループ形成』プライマー（順方向及び逆方向内側プライマー、それぞれ、FIP及びBIP）のアニーリング及び伸長、それに続く、一对の隣接プライマーのアニーリング及び伸長（F3及びB3）によって開始する。これらのプライマーの伸長は、ループ形成要素の鎖置換をもたらし、このものは、折りたたまれて、末端ヘアピンループ構造を形成する。これらの主要構造が出現すると、増幅プロセスは、自立的になり、反応混合物でのすべてのヌクレオチド（dATP、dTTP、dCTP、及びdGTP）が増幅DNAに組み込まれるまで、または、化学反応が消尽するまで、

10

【0030】

本明細書で使用する用語「プライマー」は、核酸鎖（テンプレート）に相補的なプライマー伸長産物の合成を誘導する条件下、すなわち、ヌクレオチド及びDNAポリメラーゼなどの重合剤の存在下、ならびに好適な温度及びpHに置かれると、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のことを指す。

【0031】

LAMPは、PCRよりも感度及び特異性が高く、大抵の場合、反応時間が、最速のリアルタイムPCR試験に相当する30分に満たない、標的DNA配列の増幅を可能にする。増幅する標的配列は、一般的には、長さが200～300塩基対（bp）であり、反応は、増幅プロセスの間に、同時に、幾つかのプライマーが、この配列での120bp～180bpを認識することに依存している。この高レベルのストリンジェンシーが故に、増幅が非常に特異的になり、その結果、反応における増幅DNAの出現は、標的配列全体が最初に存在した場合にのみ生じる。

20

【0032】

逆転写酵素（RT）を加えると、LAMPの応用は、RNA分子の検出にも及ぶようになる。RNA検出を含めることで、LAMPを応用することができる標的のタイプも広がり、また、特定の疾患または生理学的状態と関連しているウイルス、重要な調節非コードRNA（sRNA、miRNA）、及びRNA分子を、さらにRNAベースで標的とする能力を加える。RNAを検出する能力は、例えば、高度に発現した、安定した、及び/または豊富なメッセンジャーRNA（mRNA）またはリボソームRNA（rRNA）標的を選択する際に、アッセイ感度を高める余地も残している。増幅でのこの予備段階は、RNA分子を、相補的DNA（cDNA）へ逆転写することを含む。次いで、cDNAは、鎖置換DNAポリメラーゼのテンプレートとして機能する。熱安定性RT酵素（すなわち、NEB RTx）を使用すると、反応が、単一の温度、及び1段階の単一混合反応で完了できるようになる。

30

【0033】

本明細書で使用する「標的配列」は、本明細書で提供するポリヌクレオチドの1つ以上を使用して増幅する、検出する、または増幅及び検出の両方を行うナイセリア・ゴノレア、またはその補体の核酸配列を意味する。加えて、標的配列の用語は、場合により、二本鎖核酸配列を指すが、当業者であれば、標的配列が、一本鎖、例えば、RNAであることも理解する。特定の生物に多少なりとも特異的である標的配列を選択し得る。例えば、標的配列は、属全体、複数の属、種もしくは亜種、血清群、栄養要求型、血清型、株、分離株、または生物のその他のサブセットに対して特異的なものとし得る。

40

【0034】

本明細書に記載したプライマー/プローブ組成物、及び方法の速度、特異性、及び感度は、幾つかの態様から得られる。本発明による組成物及び方法で使用する例示的なプライ

50

マーとして、以下のものがある。

【 0 0 3 5 】

( 表 1 ) L M P プライマー

配列番号	配列 (5' ⇒ 3')
配列番号 1	CATAAGGAATACACGATGTCTTTC
配列番号 2	GATTTTCTGCATTTCTTCGACA
配列番号 3	AAGCAGGAGAAGCATCGCCTATTGGCATTGTCTTCACTGT
配列番号 4	CGCCCGAAGACCAAGACCGTCGGCAAAGGTTGGAATA
配列番号 5	GCCGCAGACTTTTCTGA
配列番号 6	TTTGAAACGCGCGCAAG
配列番号 7	AAGGCAACGTCAACGC
配列番号 8	GTCAGCACGGCCTTTG
配列番号 9	CACCGTTGTGGCAGGCACTGAGCGAACAGGAACG
配列番号 10	CAACCTTGGAGGCACGACCTGAATTTCCAATACGGCCC
配列番号 11	GTTGTCCATGAACGCGC
配列番号 12	CAGAAATTCGGTCTGGTCCA
配列番号 13	TATTCCAACCTTTGCCGAC
配列番号 14	GCCGAACTGCCCTTTG
配列番号 15	CTTTGGAAAGGCGTGGTTCATACCCGTTTACCGAAGAACAGG
配列番号 16	CAAAGGCAATACCGTAAGCTGCCATATTGTCCACACCGGC
配列番号 17	CAGAGTTGGTGTCCGAGTT
配列番号 18	CTTGCCACAACCTTGCTTC
配列番号 19	TATTTCCACAACGGCAGC

10

20

30

40

50

配列番号	配列 (5' → 3')
配列番号 20	GGCTTAGATTCCATCGGTG
配列番号 21	CCACATCTTCTTTTCGGAATGTCTTTTGGGAGCTGGATAAGGC
配列番号 22	GTGGATAACATCGTCGTATTCTTGACAGTTCCGGCATCGTG
配列番号 23	CAATTGCGCCTTACCCATG
配列番号 24	CTTTCCGGCAATGTTTCCG
配列番号 25	TTGTCGCGTTTTCGGATC
配列番号 26	CCAACCTTTGCCGACTG
配列番号 27	CATCACTACCGCATTGGG
配列番号 28	CAGACCGAATTTCTGGAAGG
配列番号 29	GCTCAGGGCGTTGACGTGTTTGAGCGTACCCTGC
配列番号 30	GCGCGTTTCATGGACAACGCGTGCCTCCAAGGTTG
配列番号 31	CCATTTGGTTCGGCGTCA
配列番号 32	GCTGTATTGCCTGCCACA
配列番号 33	CTTAGATTCCATCGGTGCG
配列番号 34	GGCAATGTTTCCGAATCAGC
配列番号 35	GCGATGCTTCTCCTGC
配列番号 36	GTGTCCGAGTTTGACCTG
配列番号 37	GAAGCGGAAGGAACGGCTTTTCCGAGACCGAAGCG
配列番号 38	CTCGCCCAAGACCAAGACTCTGCATTTCTTCGACAGTC
配列番号 39	GGCCTGTACTTGGGAAGC
配列番号 40	GCGCAAGGTGTATCCAAC
配列番号 41	GTGTCCGAGTTTGACCTGT
配列番号 42	CAACCTTGCTTCCGCC
配列番号 43	TCATTGCCATTTCCACC
配列番号 44	ATGCGGTAGGCGAGTTGCGTGGACAATATGCCGACC
配列番号 45	GGGCAGCCAGTTTGGGAGATTACCAAAGGCCCG
配列番号 46	CCCTTTGTGCCCTGAC
配列番号 47	GTGCCGCCGATGTTGA
配列番号 48	AACTCGGACACCAACTC
配列番号 49	CATTCAATGCGGTAGGC
配列番号 50	AGCAAGGTTGTGGCAAGAGGGTATGAACCACGCCTT
配列番号 51	CGCCGGTGTGGACAATGAACTGCCCTTTGTGC
配列番号 52	CAGCTTACGGTATTGCCTT
配列番号 53	ATGCCGACCAGTCAGG
配列番号 54	ATATGCCGACCAGTCAG
配列番号 55	GGGAACCTTTGGCGATTT
配列番号 56	AGCAGCGCAGCATTCAATGCACAAAGGGCAGTTC
配列番号 57	TGTTGAAGAACAGGCTGGCGGAATCATTGCCATT
配列番号 58	GTAGGCGAGTTGCGTC
配列番号 59	TTGGTGAATCCGGTGGA
配列番号 60	GAGTTGCGTCCGCCGAACTGCCTCTTGCCACAACCTTGCTTCCG
配列番号 61	ACCGCATTGAATGCTGCGCTGCTGCCCGCCAGCCTGTTCTTC
配列番号 62	TGACTGGTCGGCATATTGTCCACAC
配列番号 63	CGGACGTGCCCGCATGTT
配列番号 64	CCTTTCAAAGGCAATACCGTAAGC

10

20

30

40

50

配列番号	配列 (5' ⇒ 3')
配列番号 65	TCGCCATTTCCACCGGATTAC
配列番号 66	TGCGGTAGGCGAGTTGCGGGACAATATGCCGACCAGT
配列番号 67	TTGAATGCTGCGCTGCTGGCAGCCTGTTCTTCAACATCG
配列番号 68	CGAACTGCCCTTTGTGCC
配列番号 69	TTGGGACGGACGTGCC
配列番号 70	TGCCACAACCTTGCTTCC
配列番号 71	CGAATCATTGCCATTTCCA
配列番号 72	CTTTGAAAGGCGTGGTTCATACAAATCCGTCCGTTTACCG

10

## 【0036】

LAMP増幅産物の検出は、様々な方法で達成することができる。好ましい実施形態では、産物の検出は、蛍光標識プローブをプライマー混合物に添加して行う。本明細書で使用する用語「プローブ」は、標的配列と相補的である、または実質的に相補的である部分（複数可）を含む一本鎖核酸分子のことを指す。特定の実施態様では、蛍光標識プローブは、分子ビーコンである。

## 【0037】

本明細書で使用する「分子ビーコン」は、溶液中での特定の核酸の存在を報告するようにデザインした一本鎖ヘアピン型オリゴヌクレオチドプローブのことを指す。分子ビーコンは、4つの構成要素：ステム、ヘアピンループ、末端が標識されたフルオロフォア、及び反対の末端が標識されたクエンチャーからなる（Tyagi et al., (1998) Nature Biotechnology 16: 49-53）。ヘアピン様ビーコンが標的に結合していない場合、フルオロフォア及びクエンチャーは、互いに近くにあり、蛍光は抑制される。相補的な標的ヌクレオチド配列の存在下では、ビーコンのステムは、標的にハイブリダイズするように開いている。これにより、フルオロフォア及びクエンチャーが分離されて、フルオロフォアが蛍光を発することができるようになる。あるいは、分子ビーコンは、末端が標識されたドナーの近傍で発光するフルオロフォアも含む。「波長シフト分子ビーコン」には、フルオロフォアがより強く発光することを可能にするさらなるハーベスターフルオロフォアを組み込んでいる。分子ビーコンの現在の概説は、Wang et al., 2009, Angew Chem Int Ed Engl, 48(5): 856-870; Cissell et al., 2009, Anal Bioanal Chem 393(1): 125-35; Liet al., 2008, Biochem Biophys Res Comm 373(4): 457-61; 及びCady, 2009, Methods Mol Biol 554: 367-79を含む。

20

30

## 【0038】

ある実施形態では、分子ビーコンは、フルオロフォア、クエンチャー、及びポリヌクレオチドを含んでおり、当該ポリヌクレオチドは、配列番号73~76からなる群から選択される配列を含む。一部の実施形態では、当該ポリヌクレオチドは、配列番号73のヌクレオチド6~22、配列番号74のヌクレオチド5~24、配列番号75のヌクレオチド3~21、及び配列番号76のヌクレオチド3~24からなる群から選択される配列を含む。上記した配列を有するポリヌクレオチドは、1つ以上の非天然ヌクレオチドまたは結合、例えば、特に、ペプチド核酸（PNA）、モルホリン、ロック核酸（LNA）、グリコール核酸（GNA）、及びトレース核酸（TNA）を含むことができる。一部の実施形態では、分子ビーコンのポリヌクレオチドは、1~6つのロック核酸を含む。好ましい実施形態では、分子ビーコンのポリヌクレオチドは、3つのロック核酸を含む。別の好ましい実施形態では、分子ビーコンのポリヌクレオチドは、4つのロック核酸を含む。

40

## 【0039】

本明細書で使用する用語「標識」は、検出することが可能な、任意に、定量することが可能な特性または特徴を有する分子または部分を意味する。標識は、例えば（かつ、限定

50

するものではない)放射性同位元素、フルオロフォア、化学発光団、酵素、コロイド粒子、蛍光微粒子などと同様に、直接的に検出することができる;または、例えば、特定の結合メンバーと同様に、間接的に検出することができる。直接的に検出可能な標識は、標識の検出及び/または定量を可能にするために、例えば、基質、トリガー試薬、消光部分、光などのさらなる構成要素を必要とし得る、ことを理解されたい。間接的に検出可能な標識は、使用する場合には、一般的には、「コンジュゲート」と組み合わせて使用する。コンジュゲートは、一般的には、直接的に検出可能な標識に結合または連結している特定の結合メンバーである。コンジュゲートを合成するためのカップリング化学は、当該技術分野で周知であり、例えば、特定の結合メンバーの特定の結合特性、または標識の検出可能な特性を破壊しないあらゆる化学的手段及び/または物理的手段を含むことができる。本  
10  
明細書で使用する「特異的結合メンバー」は、結合対のメンバー、すなわち、分子の一方が、例えば、化学的または物理的手段を介して、他方の分子に特異的に結合する2つの異なる分子を意味する。抗原及び抗体特異的結合対に加えて、その他の特異的結合対は、アビジン及びビオチン;ハプテン及びハプテンに特異的な抗体;相補的ヌクレオチド配列;酵素補因子または基質及び酵素;などを意図しているが、これらに限定されない。

#### 【0040】

分子ビーコンは、DNAまたはRNAなどの核酸のみで構成することができる、またはペプチド核酸(PNA)コンジュゲートで構成することができる。フルオロフォアは、あらゆる蛍光有機色素、または単一量子ドットとすることができる。消光部分は、望ましくは、フルオロフォアの発光を消光する。フルオロフォアの発光を消光するあらゆる消光部分を使用することができる。フルオロフォアは、当該技術分野で公知のあらゆる蛍光マー  
20  
カー/色素とし得る。好適な蛍光マーカの例として、Fam、Hex、Tet、Joe、Rox、Tamra、Max、Edans、Cy5などのCy色素、フルオレsein、クマリン、エオシン、ローダミン、Bodipy、Alexa、Cascade Blue、Yakima Yellow、ルシファーイエロー、テキサスレッド、及びATTO色素のファミリーがあるが、これらに限定されない。クエンチャーは、当該技術分野で公知のあらゆるクエンチャーとし得る。クエンチャーの例として、Dabcyl、Dark  
30  
Quencher、Eclipse Dark Quencher、Elite Quencher、Tamra、BHQ、及びQSYがあるが、これらに限定されない(これらはすべて登録商標である)。当業者であれば、プローブをデザインする場合に、色素/クエンチャーのいずれの組み合わせが適切であるかを理解している。例示的な実施形態では、フルオレsein(FAM)は、Blackhole Quencher(商標)(BHQ(商標))(Novato, Calif.)と組み合わせて使用する。次いで、分子ビーコンの増幅産物への結合を、直接に視覚的に評価することができる。あるいは、感度を向上させるために、蛍光レベルを分光法で測定することができる。

#### 【0041】

様々な業者、例えば、Abingdon Health(UK;www.abingdonhealth.com)、Attostar(US,MN;www.attostar.com)、Biolegio(NLD;www.biolegio.com)、Biomers.net(DEU;www.biomers.net)、Biosearch  
40  
Technologies(US,CA;www.biosearchtech.com)、Eurogentec(BEL;www.eurogentec.com)、GeneLink(US,NY;www.genelink.com)、Integrated DNA Technologies(US,IA;www.idtdna.com)、Isogen Life Science(NLD;www.isogen-lifescience.com)、Midland Certified Reagent(US,TX;www.oligos.com)、Eurofins(DEU;www.eurofinsgenomics.eu)、Sigma-Aldrich(US,TX;www.sigmaaldrich.com)、Thermo Scientific(US,MA;www.thermoscientific.com)、TIB MOLBI  
50

OL (DEU; www.tib-molbiol.de)、TriLink Bio Technologies (US, CA; www.trilinkbiotech.com) などが、標準及びカスタム分子ビーコンを製造している。Stratagene (La Jolla, Calif.) 製の Sentinel (商標) Molecular Beacon Allelic Discrimination Kits、ならびに Eurogentec SA (Belgium, eurogentec.com) 及び Isogen Bioscience BV (The Netherlands, isogen.com) 社製の様々なキットなど、分子ビーコンを用いる様々なキットも市販されている。

#### 【0042】

本発明のオリゴヌクレオチドプローブ及びプライマーを、任意に、当該技術分野で公知の本質的にあらゆる手法を使用して調製する。特定の実施形態では、例えば、本明細書に記載したオリゴヌクレオチドプローブ及びプライマーは、例えば、参照により援用する Beaucage and Caruthers (1981), Tetrahedron Setts. 22 (20): 1859-1862 に記載されている固相ホスホルアミダイトリエステル法、または、例えば、参照により援用する Needham-VanDevanter et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12: 6159-6168 に記載されている自動合成を使用する当該技術分野で公知の別の合成手法によるものなど、本質的にあらゆる核酸合成法を使用して化学的に合成する。自動オリゴヌクレオチド合成のための多種多様な装置が市販されている。マルチヌクレオチド合成手法 (例えば、トリヌクレオチド合成など) も任意に用いる。さらに、本明細書に記載したプライマー核酸は、任意に、種々の修飾を含む。さらに説明すると、プライマーも、任意に、例えば、参照により援用する 1999年12月14日に発行された米国特許第6,001,611号に記載されている増幅反応の特異性を改善するために修飾する。また、プライマー及びプローブは、本明細書に記載している、または別途当該技術分野で公知のその他の様々な修飾を用いて合成することができる。

#### 【0043】

さらに、本質的にあらゆる核酸 (及び、標準であれ非標準であれ、実質的にあらゆる標識核酸) は、Integrated DNA Technologies、Midland Certified Reagent Company、Eurofins、Biosearch Technologies、Sigma Aldrich、及びその他の数多くの業者など、様々な供給業者のいずれかに対して、カスタムまたは標準で注文することができる。

#### 【0044】

試験試料は、一般的に、N.ゴノレア感染症と疑われる対象、通常は、哺乳動物対象、より一般的には、ヒト対象に由来する、またはそれらから単離する。例示的な試料または標本としては、血液、血漿、血清、尿、滑液、精液、精漿、前立腺液、膿液、頸管粘液、子宮液、頸管擦過物、羊水、肛門擦過物、粘液、痰、組織などがある。これらの試料を取得するための本質的にあらゆる手法、例えば、擦過、静脈穿刺、スワビング、生検、または当該技術分野で公知のその他の手法などを任意に用いる。

#### 【0045】

本明細書で使用する用語「試験試料」は、標的配列を含有すると疑われる、または潜在的に含有する生物または生体液から採取した試料を意味する。試験試料は、あらゆる生物学的供給源、例えば、組織、血液、唾液、痰、粘液、汗、尿、尿道スワブ、頸管スワブ、膣スワブ、泌尿生殖器または肛門スワブ、結膜スワブ、眼レンズ液、脳脊髄液、乳、腹水、滑液、腹腔液、羊水、発酵ブロス、細胞培養物、化学反応混合物などから採取することができる。試験試料は、(i) 供給元から入手されるものは直ちに、または(ii) 前処理の後に、試料の特性を改変するために使用することができる。したがって、試験試料は、例えば、血液から血漿または血清を調製すること、細胞またはウイルス粒子を破壊すること、固体材料から液体を調製すること、粘性流体を希釈すること、液体を濾過すること、液体を蒸留すること、液体を濃縮すること、干渉成分の不活化、試薬の添加、核酸の精

10

20

30

40

50

製などを行って、使用前に前処理することができる。

【0046】

有利なことに、本発明は、尿試料などの臨床試料でのナイセリア・ゴノレアの、信頼可能な迅速検出を可能にする。

【0047】

さらに、説明するために、本明細書に記載した標的核酸を分析する前に、それらの核酸は、一般的には、異なる成分の複雑な混合物を含んでいる試料から精製または単離し得る。収集した試料中の細胞は、一般的には、細胞の内容物を放出するために溶解する。例えば、特定の試料中のN・ゴノレア、及びその他の細胞は、それらを種々の酵素、化学物質と接触させて溶解することができる、及び/または、例えば、細菌の細胞壁を分解する当該技術分野で公知のその他の手法で溶解させることができる。一部の実施形態では、核酸を、細胞溶解物において直接に分析する。その他の実施形態では、核酸を、検出の前に、細胞溶解物からさらに精製または抽出する。本質的にあらゆる核酸抽出方法は、本発明の方法で用いる試料中の核酸を精製するために使用することができる。核酸を精製するために使用することができる例示的な手法として、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、固体支持体に固定化したプローブに対するハイブリダイゼーション、液液抽出（例えば、フェノール-クロロホルム抽出など）、沈殿（例えば、エタノールなどを使用するもの）、濾紙を用いる抽出、ミセル形成試薬（例えば、セチル-トリメチル-アンモニウム-プロミドなど）を用いる抽出、固定化したインターカレーション色素（例えば、臭化エチジウム、アクリジンなど）に対する結合、シリカゲルもしくは二原子土への吸着、カオトロピック条件下での磁性ガラス粒子もしくは有機シラン粒子への吸着、及び/または同類のものがある。また、試料処理は、例えば、米国特許第5,155,018号、同第6,383,393号、及び同第5,234,809号（これらのそれぞれを、参照により援用する）に記載されている。

10

20

【0048】

試験試料は、任意に、増幅効率及び/または定性的精度及び/または定量的精度を改善するために、当業者であれば、公知のあらゆる手法に従って処理及び/または精製し得る。したがって、試料は、精製、単離、または化学合成によって得たか否かに関係なく、もっぱら、または本質的に核酸（複数可）からなり得る。試験試料からDNAなどの核酸の単離または精製を望む当業者であれば、例えば、頸管擦過物のDNAを単離または精製する手段を用いることができる（例えば、QIAamp-DNA Mini-Kit; Qiagen, Hilden, Germany）。

30

【実施例】

【0049】

以下の実施例は、当業者に対して本発明の製造方法と使用方法の完全な開示と説明を提供するためのものであり、発明者が発明と見なす範囲に制限を加えること意図するものではなく、また、以下に示した実験が、実行した全部または唯一の実験であることを示すことを意図するものでもない。使用する数値（例えば、量、温度など）に関して正確性を確保するための努力を払っているが、若干の実験誤差と偏差は考慮すべきである。特記しない限り、部は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏温度であり、そして、圧力は、大気圧またはその近傍の圧力である。

40

【0050】

実施例1：標的の選択、配列分析、及びアッセイのデザイン

ナイセリア・ゴノレア及び密接に関連する種、すなわち、ナイセリア・メニンギティディス (*Neisseria meningitidis*)、ナイセリア・ラクタミカ (*Neisseria lactamica*)、ナイセリア・シッカ (*Neisseria sicca*)、及びナイセリア・シネレア (*Neisseria cinerea*) の配列を、National Center for Biotechnology Information (NCBI)、またはPathosystems Resource Integration Center (PATRIC) データベースから入手した。C

50

lustal Omega (Sievers, et al. (2011). Molecular Systems Biology 7: 539)、またはMAFFT (Kato, Standley 2013. Molecular Biology and Evolution 30: 772-780)を使用して配列を整列させ、そして、N.ゴノレアに特有の領域を、プライマー及び分子ビーコンプローブのデザインのために選択した。

#### 【0051】

プライマー/プローブをベースとした検出アッセイは、反応への逆転写酵素の追加による、RNAを標的とするループ介在等温増幅(RT-LAMP)を用いるようにデザインした。標的に特異的な蛍光検出を提供するために、5'フルオロフォア/3'クエンチャー修飾、6-カルボキシフルオレセイン及びBlack Hole Quencher 1を備えた分子ビーコンプローブを使用した。N.ゴノレア RT-LAMPプライマーセット(表1及び表2)は、ソフトウェアプログラム、例えば、Premier BiosoftのLAMP Designer、Beacon Designer、当社のスクリプト及びマニュアルデザインなどの組み合わせを使用してデザインした。結果として予測したアンプリコンを、ヒトのトランスクリプトームを含むNCBIヌクレオチドデータベースに対してさらにBlastで検索を行い、そして、ナイセリア属(Neisseria)内での個々の非ゴノレア(gonorrhoeae)種に対してBlastで検索をして、アッセイの特異性をさらに予測した。

#### 【0052】

本発明のプライマーセットを、表2にまとめており、そこには、少なくとも、フォワードインナープライマー(FIP)と、バックワードインナープライマー(BIP)を記載している。さらに、プライマーセットは、一般的には、フォワードアウタープライマー(F3)、バックワードアウタープライマー(B3)、フォワードループプライマー(LF)、及びバックワードループプライマー(LB)から選択される少なくとも2つのさらなるプライマーも含む。

#### 【0053】

(表2) LMPプライマーセット

セット	F3	B3	FIP	BIP	LF	LB
セット-1	配列番号1	配列番号2	配列番号3	配列番号4	配列番号5	配列番号6
セット-2	配列番号7	配列番号8	配列番号9	配列番号10	配列番号11	配列番号12
セット-3	配列番号13	配列番号14	配列番号15	配列番号16	配列番号17	配列番号18
セット-4	配列番号19	配列番号20	配列番号21	配列番号22	配列番号23	配列番号24
セット-5	配列番号13	配列番号25	配列番号9	配列番号10	配列番号11	配列番号12
セット-6	配列番号26	配列番号14	配列番号15	配列番号16	配列番号17	配列番号18
セット-7	配列番号27	配列番号28	配列番号29	配列番号30	配列番号31	配列番号32
セット-8	配列番号19	配列番号33	配列番号21	配列番号22	配列番号23	配列番号34
セット-9	配列番号35	配列番号36	配列番号37	配列番号38	配列番号39	配列番号40
セット-10	配列番号13	配列番号14	配列番号72	配列番号16	配列番号41	配列番号18
セット-11	配列番号42	配列番号43	配列番号44	配列番号45	配列番号46	配列番号47
セット-12	配列番号48	配列番号49	配列番号50	配列番号51	配列番号52	配列番号53
セット-13	配列番号54	配列番号55	配列番号56	配列番号57	配列番号58	配列番号59
セット-14	配列番号64	配列番号65	配列番号60	配列番号61	配列番号62	配列番号63
セット-15	配列番号70	配列番号71	配列番号66	配列番号67	配列番号68	配列番号69

## 【0054】

一般的に、3～5 μLの抽出した核酸材料またはネガティブコントロール（NU = ネガティブ尿；NTC = ヌクレアーゼ不含水、またはTris緩衝剤、テンプレートコントロールなし）が、RT-LAMP反応のテンプレートの役割を果たした。総量が10～25 μLである反応物を、1×増幅緩衝剤を含む製剤を含有する混合物として氷上で調製を行い、当該増幅緩衝剤は、10～40 mM Tris-HCl、0～0.5% Tween 20、0～300 mM トレハロース、5～70 mM KCl、4～10 mM MgSO<sub>4</sub>、10～20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0～2 mM TCEP、及びそれぞれ1.6～2 mMであるdCTP、dGTP、dATP、及びdTTPを含んでいた。NEB Bst2ポリメラーゼ（NEB CN#M0537L）、及びRTx Warmstart逆転写酵素（NEB CN#M0380S）酵素。プライマー（2 μM インナープライマー、0.2 μM アウタープライマー、及び0.8 μM ループプライマー）を、個々の反応に追加する、または、実験計画に従って必要に応じてマスターミックスに直接に加えた。以下の実施例に示したように、分子ビーコン（0.2 μM）または200 nM Yo-Pro-1、Yo-Pro-3、またはTo-Pro色素も、マスターミックスに加えた。増幅反応は、標準の6つのプライマーミックスまたは7つのプライマーミックス（セット16～27）を使用して調製した。マスターミックスを、個々の試料テンプレートに分注し、ボルテックスし、次いで、短時間の遠心分離を行い、そして、それぞれの反応を、96または384 ウェルプレート（Roche CN# 4729692001、またはBioRad CN#hsI9605）の個々のウェルにロードした。反応は、60～67 °Cの範囲の温度で行い、そして、Roche LightCycler 96リアルタイムPCR機器またはBioRad CFX96リアルタイムサイクラーのいずれかで蛍光をモニタリングした。標的増幅を、標的に結合する挿入色素または分子ビーコンプローブを介してモニタリングをしたところ、分子内の蛍光が消えている分子ビーコンの放出に至った。

10

20

## 【0055】

実施例2：色素検出を伴うLAMP

ネガティブ尿マトリックスに、滴定を終えたN.ゴノレア（PBSで段階希釈したZeptometrix CN#0801482、ATCC CN#19424、またはATCC CN#49226）を加えた。標準的な抽出方法を使用して、加えた試料から核酸を抽出し、そして、LAMPプライマー（表2に記載したもの）を使用して試料を増幅した。YoPro（商標）色素または同じ色素セットファミリー内の互換性のある波長バージョン（Life Technologies；緑色蛍光カルボシアニン核酸染色）を使用して、増幅産物を検出した。マスターミックスは、実施例1に記載したようにして調製した。結果を、表3にまとめた。NTは、試験していない条件を示す。「Amp無し」は、増幅が検出されなかったことを示す。

30

## 【0056】

（表3）ポジティブになるまでの時間（色素検出）

40

50

セット	5x10 <sup>3</sup> CFU/mL	5 CFU/mL	NTC	NU
セット-12	12.89	21.66	Amp無し	Amp無し
セット-13	6.28±0.18	9.22±0.26	42.2 (2つのうち1つ)	Amp無し
セット-14	7.55	10.93	29.03	34.98
セット-15	4.68	6.88	39.71	42.84
セット-2	5.5±0.099	7.94±0.13	26.36±1.46	45.18±1.95
セット-3	9.47±0.11	13.64±0.37	Amp無し	Amp無し
セット-4	5.90±0.03	8.63±0.20	33.09±5.23	34.87±4.18
セット-5	5.15±0.15	7.57±0.16	29.72±10.81	24.31±4.96
セット-6	9.58±0.01	14.10±1.00	Amp無し	Amp無し
セット-7	6.59±0.01	9.42±0.09	Amp無し	35.84±3.22
セット-8	5.26±0.19	7.57±0.01	36.17±1.19	29.5±1.53
セット-1	12.56±0.94* (*5x10 <sup>2</sup> CFU/mL)	Amp無し	Amp無し	NT
セット-9	4.25 (*5x10 <sup>2</sup> CFU/mL)	5.00±0.68	37.31 (3つのうち1つ)	NT
セット-10	7.42 (*5x10 <sup>2</sup> CFU/mL)	11.18±0.25	Amp無し	NT
セット-11	4.90 (*5x10 <sup>2</sup> CFU/mL)	5.92±1.15	25.522.15 (3つのうち3つ)	NT

10

20

## 【 0 0 5 7 】

## 実施例 3 : 特異性

実施例 2 に記載したプライマーセットのサブセットに関して、 $5 \times 10^3$  及び 5 CFU / mL の抽出した N . ゴノレア核酸テンプレート ( NG ) との反応を、 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  CFU / mL の密接に関連するナイセリア属 ( *Neisseria* ) 種 ( *Zepthometrix* から購入した滴定を終えた生きた株 )、ナイセリア・メニンギティディス ( *Neisseria meningitidis* ) ( NM )、ナイセリア・ラクタミカ ( NL )、及びナイセリア・シッカ ( NS ) から抽出した核酸テンプレートの反応、ネガティブ尿抽出物、またはテンプレートコントロールなし ( NTC ) と比較して、特異性に関する試験をさらに行った。実施例 1 に記載したようにして増幅反応を行ったところ、試験した幾つかのプライマーセットは、さらなる *Neisseria* 種に対してある程度の交差反応性を示した ( 表 4 )。

30

## 【 0 0 5 8 】

( 表 4 ) 交差反応性 ( 色素検出 )

40

50

セット	T <sub>p</sub> NG 5x10 <sup>3</sup> CFU/mL	NL	NS	NM	NTC	ネガティブ尿
セット-12	12.89	Amp無し	Amp無し	Amp無し	Amp無し	Amp無し
セット-13	6.28±0.18	Amp無し	Amp無し	Amp無し	42.2 (2つのうち1つ)	Amp無し
セット-14	7.55	30.88	37.03	コール無し	29.03	34.98
セット-15	4.68	35.38	49.98	47.75	39.71	42.84
セット-2	5.5±0.099	29.87 ± 13.72	44.95±3.75	28.41±11.02	26.36±1.46	45.18±1.95
セット-3	9.47±0.11	Amp無し	Amp無し	Amp無し	Amp無し	Amp無し
セット-4	5.90±0.03	18.46 ± 4.28	18.53 ± 7.46	18.48 ± 7.55	33.09±5.23	34.87±4.18
セット-5	5.15±0.15	34.5±0.55	22.10±2.38	35.98±9.96	29.72±10.81	24.31±4.96
セット-6	9.58±0.01	Amp無し	Amp無し	Amp無し	Amp無し	Amp無し
セット-7	6.59±0.01	26.3 (2つのうち1つ)	Amp無し	Amp無し	Amp無し	35.84±3.22
セット-8	5.26±0.19	30.18±3.00	30.45±3.97	33.53±5.54	36.17±1.19	29.5±1.53
セット-1	12.56±0.94* (*5x10 <sup>2</sup> CFU/mL)	Amp無し	Amp無し	24.33±0.52	Amp無し	NT
セット-9	4.25 (*5x10 <sup>2</sup> CFU/mL)	NT	NT	NT	37.31 (3つのうち1つ)	NT
セット-10	7.42 (*5x10 <sup>2</sup> CFU/mL)	NT	NT	NT	Amp無し	NT
セット-11	4.90 (*5x10 <sup>2</sup> CFU/mL)	NT	NT	NT	25.522.15 (3つのうち3つ)	NT

10

20

## 【 0 0 5 9 】

## 実施例 4 : 分子ビーコンの検出

配列をベースとした（間接的な色素検出とは対照的な）増幅産物の直接的なさらなる検出レベルを提供するために、感度を兼ね備えた有望な T<sub>p</sub> を有する N . ゴノレアアンプリコンのプライマーセットでの固有のヌクレオチドを標的とする分子ビーコン、すなわち、MB1 ~ MB4（それぞれ、配列番号 73 ~ 76）をデザインし、そして、生菌から抽出した核酸からの増幅を検出するために用いた（表 5）。分子ビーコンプローブは、5'フルオロフォア / 3'クエンチャー修飾（6-カルボキシフルオレセイン（FAM））と、Black Hole Quencher 1（BHQ1）を使用してデザインしており、標的特異的な蛍光検出を提供する。

30

## 【 0 0 6 0 】

（表 5）プローブの配列決定

ID	フルオロフォア	クエンチャー	配列 (5' → 3')	配列番号
MB1	FAM	BHQ1	CCGCA <b>ACGTGCCCGCCGATGTTG</b> CGG	配列番号 73
MB2	FAM	BHQ1	GCGT <b>GACGGACGTGCCCGCCGATGT</b> CACGC	配列番号 74
MB3	FAM	BHQ1	CG <b>TTGGGACGGACGTGCCGCCA</b> ACG	配列番号 75
MB4	FAM	BHQ1	CG <b>GGGACGGACGTGCCCGCCGATGT</b> CCCCG	配列番号 76

40

50

## 【 0 0 6 1 】

10 ~ 25  $\mu$ l の総量反応を、実施例 1 に記載した方法に従って、テンプレート材料である  $5 \sim 5 \times 10^3$  CFU/mL の N . ゴノレア抽出物からの溶出液を使用して評価した。分子ビーコンを検出に使用すると、反応 T p がわずかに増加したが、配列に基づいて増幅産物を直接に検出して、それにより、密接に関連する種と識別できる、ことが望ましい結果である。

## 【 0 0 6 2 】

(表 6) ポジティブ交差反応性になるまでの時間 (プローブ検出)

プライマー	ビーコン	$5 \times 10^3$ CFU/mL	5 CFU/mL	NL	NS	NM	NC	NU	NTC
セット-13	MB1	9.49	13.61	Amp無し	Amp無し	Amp無し	Amp無し	Amp無し	Amp無し
セット-13	MB2	8.42	12.01	NT	NT	NT	NT	NT	Amp無し
セット-13	MB3	8.82 $\pm$ 0.71	12.54 $\pm$ 0.81	Amp無し	Amp無し	Amp無し	19.8	Amp無し	Amp無し
セット-13	MB4	8.25 $\pm$ 0.89	11.72 $\pm$ 0.60	Amp無し	Amp無し	Amp無し	22.01	Amp無し	Amp無し
セット-14	MB1	10.55 $\pm$ 0.03	14.47 $\pm$ 0.39	Amp無し	Amp無し	Amp無し	21.32	Amp無し	Amp無し
セット-14	MB2	12.44 $\pm$ 0.04	16.94 $\pm$ 0.11	Amp無し	Amp無し	Amp無し	25.14	Amp無し	Amp無し
セット-14	MB3	10.95 $\pm$ 0.16	14.71	Amp無し	Amp無し	Amp無し	23.04	Amp無し	Amp無し
セット-14	MB4	11.15 $\pm$ 0.06	14.94 $\pm$ 0.03	Amp無し	Amp無し	Amp無し	24.01	Amp無し	Amp無し
セット-15	MB1	4.74 $\pm$ 0.60	7.76 $\pm$ 0.73	Amp無し	Amp無し	Amp無し	18.16	13.48	Amp無し
セット-15	MB2	8.09 $\pm$ 0.06	11.26 $\pm$ 0.11	Amp無し	Amp無し	Amp無し	31.33	Amp無し	Amp無し
セット-15	MB3	7.43 $\pm$ 0.12	10.18 $\pm$ 0.47	Amp無し	Amp無し	Amp無し	24.17	32.86	Amp無し
セット-15	MB4	7.97 $\pm$ 0.13	10.4 $\pm$ 0.10	35.23	Amp無し	Amp無し	27.53	Amp無し	Amp無し

## 【 0 0 6 3 】

25  $\mu$ l の総量反応を、テンプレート材料である 3 CFU/mL のナイセリア・ゴノレア抽出物からの溶出液を使用して調製した。実施例 1 に記載した方法に従って、反応を行った。

## 【 0 0 6 4 】

(表 7) ポジティブになるまでの時間 (プローブ検出)

プライマー	ビーコン	3 CFU/mL	ポジティブ の頻度	NTC
セット-13	配列番号 75	18.76 $\pm$ 2.34	67%	Amp無し
セット-15	配列番号 75	18.28 $\pm$ 0.21	67%	Amp無し

## 【 0 0 6 5 】

実施例 5 : 拡大したベンチ感度評価

複数名の匿名ドナーから得た尿マトリックスプールをスクリーニングして、N . ゴノレ

10

20

30

40

50

アの陰性状態の確認を行い、等分し、そして、-80 で保存した。N.ゴノレア(ATCC CN#19424)を、Mueller Hinton培地で段階希釈を行い、そして、N.ゴノレアを加えたプールした尿アリコート解冻して、ベンチ抽出及びウェットベンチRT-LAMPで推定したアッセイ感度の最終濃度を10x、3x、1x、0.5x、または0.25xにした。安定化溶液を含む試料と、含まない試料とを調製した。安定化溶液の有無に関係なく、ネガティブ尿コントロールも使用した。用いた特定の試料及び安定剤の体積については、表8を参照されたい。

【0066】

標準的な抽出方法を使用して、添加を終えた試料から核酸を抽出し、そして、実施例2で説明したようにして、LAMPプライマーセット-15を使用して、試料を増幅した。分子ビーコン、配列番号75を、増幅産物の検出のために使用した。マスターミックスは、実施例1に記載したようにして調製した。結果を、表9にまとめている。NTは、試験をしていない条件を示す。「Amp無し」は、増幅が検出されなかったことを示す。

10

【0067】

(表8) 試料調製のために使用した尿と安定剤の体積

試料	試料調整		試験
	安定剤 (mL)	加えた尿 (mL)	処理した体積 (mL)
新鮮尿、安定剤なし	0	1	1
尿+安定剤	3	6	1

20

【0068】

(表9) ポジティブになるまでの時間(プローブ検出)

濃度 (CFU/mL)	安定剤の有/無	Tp (分)	ポジティブの頻度
2	無し	8.43±0.37	20/20
0.6		8.79±0.29	45/45
0.2		9.80±1.16	38/45
0.1		10.51±1.31	45/45
0.05		11.08±1.11	43/45
0		Amp無し	0/5

30

【0069】

上記した発明は、理解を深めるために例示しており、また実施例としてある程度詳細に説明してきたが、当業者であれば、本発明の教示に照らして、添付した特許請求の範囲の技術思想または範囲から逸脱することなく、特定の変更及び修正を加えることができることは自明である。本発明の範囲は、添付した特許請求の範囲によってのみ限定を受けるものであり、本明細書で使用した用語は、特定の実施形態を説明することだけを目的としており、限定を意図するものではない、ことも理解されたい。

40

【0070】

したがって、上記は、本発明の原理を単に例示しているにすぎない。当業者であれば、本明細書に明示的に記載または示されてはいないが、本発明の原理を具体化し、その技術

50

思想及び範囲に含まれる様々な態様を考案することができる、ことを理解されたい。さらに、本明細書に記載したすべての実施例、及び条件を付けた言語は、主に、読者が、本発明の原理と、本発明者らが当該技術分野の発展に寄与した概念の理解を補助することを意図したものであり、そして、そのような具体的に記載した実施例や条件による限定を受けない、ものとして解釈するべきである。さらに、本発明の原理、態様、及び実施形態、ならびにそれらの特定の実施例を列挙した本明細書のすべての記載は、その構造的均等物及び機能的均等物の両方を含む、ことを意図している。さらに、そのような均等物には、現在公知の均等物と、将来に開発される均等物の両方、すなわち、構造に関係なく、同じ機能を示す開発された要素の両方を含む、ことを意図している。したがって、本発明の範囲は、本明細書に示し、そして、説明した例示的な実施形態に限定することを意図していない。むしろ、本発明の範囲及び技術思想は、添付した特許請求の範囲によって具体化している。

10

【配列表】

2022542361000001.app

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 2043620

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC - C07H 21/04, C07K 14/22, A61P 31/04, C12Q 1/68 (2020.01)  
 CPC - C12Q 1/689, C12Q 2600/16, Y10S 435/871, Y10S 435/822

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

10

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
 See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2016/0024562 A1 (ABBOTT MOLECULAR INC.) 28 January 2016 (28.01.2016) Abstract; Claim 5; Claim 9	1, 4-12, 26-28
A	WO 2002/079243 A2 (CHIRON SPA et al.) 10 October 2002 (10.10.2002) p341, SEQ ID 4451; p343, SEQ ID 4475	1, 4-12, 26-28
A	GenBank submission LR606187.1, Aquila chrysaetos chrysaetos genome assembly, chromosome: 7, 04 July 2019 [online]. [Retrieved on 23 November 2020]. Retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LR606187>, Entire document	1, 4-12, 26-28
A	GenBank submission EK565433.1, 1095521038908 Global-Ocean-Sampling_GS-32-01-01-1P3-1P6KB marine metagenome genomic clone 1061005956854 5', genomic survey sequence, 26 May 2010 [online]. [Retrieved on 23 November 2020]. Retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EK565433>, Entire document	1, 4-12, 26-28
A	GenBank submission LS483369.1, Neisseria cinerea strain NCTC10294 genome assembly, chromosome: 1, 17 June 2018 [online]. [Retrieved on 23 November 2020]. Retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LS483369>, Entire document	1, 4-12, 26-28
A	GenBank submission AE004969.1, Neisseria gonorrhoeae FA 1090, complete genome, 1 July 2015 [online]. [Retrieved on 23 November 2020]. Retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AE004969>, Entire document	1, 4-12, 26-28

20

30

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
23 November 2020

Date of mailing of the international search report  
**31 DEC 2020**

40

Name and mailing address of the ISA/US  
 Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
 P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450  
 Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer  
 Lee Young  
 Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 20/43620

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
—Please see continuation in first extra sheet —

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1, 4-12, 26-28, limited to primer Set-1 (SEQ ID NOs: 1-6) and probe of SEQ ID NO:73

20

30

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/US 20/43620

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+, Claims 1-13, 26-28, directed to a composition comprising a sequence-specific primer set. The composition will be searched to the extent that the composition encompasses a primer set consisting of Set-1 comprising SEQ ID Nos:1-6, and a probe wherein the probe comprises nucleotides 6-22 of SEQ ID NO: 73 (note, these are the first claimed sequences for a primer set and probe of the inventive composition). It is believed that claims 1, 4-12, 26-28 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the composition encompasses a primer set consisting of Set-1 comprising SEQ ID Nos:1-6 and a probe wherein the probe comprises nucleotides 6-22 of SEQ ID NO: 73. Additional composition(s) comprising additional primer set(s) and/or probe sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected composition(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a composition comprising a primer set consisting of Set-2 comprising SEQ ID Nos:7-12 and a probe wherein the probe comprises nucleotides 6-22 of SEQ ID NO: 73 (claims 1, 4-12, 26-28).

10

Group II+, Claims 14-25, directed to a method of detecting *Neisseria gonorrhoeae* in a test sample. Group II+ will be searched upon payment of additional fees. The method may be searched, for example, to encompass a sequence-specific primer set of Set-1 comprising SEQ ID Nos:1-6 and a probe wherein the probe comprises nucleotides 6-22 of SEQ ID NO: 73 for an additional fee and election as such. It is believed that claims 14-20, 23-25 read on this exemplary invention. Additional method(s) comprising additional primer set(s) and/or probe sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected method(s) comprising additional primer set(s) and/or probe sequence(s). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be a method comprising a primer set consisting of Set-2 comprising SEQ ID Nos:7-12 and a probe wherein the probe comprises nucleotides 6-22 of SEQ ID NO: 73 (claims 14-20, 23-25).

20

The inventions listed as Group I+ and Group II+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

**Special technical features**

The inventions of Group I+ and Group II+ each include the special technical feature of a unique nucleic acid sequence. Each nucleic acid sequence comprises a unique probe, and is considered a distinct technical feature. Additionally, Group I+ has the special technical feature of a primer set composition, that is not required by Group II+. Group II+ has the special technical feature of a detection method, that is not required by Group I+.

**Common technical features**

No technical features are shared between the primers and/or probe nucleic acid sequences in each of Groups I+ and II+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ and II+ were considered to share the technical features of including: a sequence-specific primer set, these shared technical features are previously disclosed by prior art, as discussed below.

Group II+ inventions additionally share the technical feature of: method of detecting *Neisseria gonorrhoeae* in a test sample, the method comprising: extracting nucleic acid from the test sample; amplifying a target sequence by reacting the nucleic acid extracted in step (a) with a reaction mixture comprising a strand displacement DNA polymerase and a sequence-specific primer set, wherein said sequence-specific primer set is selected from the group consisting of Set-1 through Set-15; and detecting the presence or absence of an amplified product of step (b), wherein the presence of said amplification product is indicative of the presence of *Neisseria Gonorrhoeae* in the test sample. However, these shared technical features are previously disclosed by US 2016/0024562 A1 to Abbott Molecular Inc., (hereinafter 'Abbott').

30

-----please see continuation on next sheet-----

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 20/43620

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

-----continued from previous sheet-----

Abbott teaches a method of detecting *Neisseria gonorrhoeae* in a test sample (Abstract - 'Polynucleotides useful for detecting *Chlamydia trachomatis* and/or *Neisseria gonorrhoeae* in a test sample, kits, a nucleic acid amplification method and detection method including the same.'; Claim 9 - 'A method of amplifying *Chlamydia trachomatis* and/or *Neisseria gonorrhoeae* in a test sample'), the method comprising:

amplifying a target sequence by reacting the nucleic acid extracted in step (a) with a reaction mixture comprising a DNA polymerase and a sequence-specific primer set (Claim 9 - 'said method comprising: (a) forming a reaction mixture comprising nucleic acid amplification reagents, a test sample potentially containing a *Chlamydia trachomatis* and/or *Neisseria gonorrhoeae* target sequence a composition according to claim 1; and (b) subjecting the mixture to amplification conditions to generate at least one copy of a nucleic acid sequence complementary to the target sequence.'; para [0114] - 'PCR was performed in 1x GeneAmp PCR Gold Buffer, 0.25 mM EDTA and 0.125 mM EGTA. Amplitaq Gold DNA polymerase was used'; Claim 5 - 'A primer/probe set selected from the primer/probe sets consisting of: Primer and Probe Set 1 (SEQ ID NOs: 1, 4, and 5);'), and detecting the presence or absence of an amplified product of step (b), wherein the presence of said amplification product is indicative of the presence of *Neisseria Gonorrhoeae* in the test sample (Claim 11 - '(c) hybridizing the probe to the nucleic acid sequence complementary to the target sequence, so as to form a hybrid comprising the probe and the nucleic acid sequence complementary to the target sequence; and (d) detecting the hybrid as an indication of the presence of *Chlamydia trachomatis* and/or *Neisseria gonorrhoeae* in the test sample.'). Abbott does not expressly teach extracting nucleic acid from the test sample, or use of a strand displacement DNA polymerase. However, since Abbott teaches use of SDA (para [0036] - 'Amplification procedures are well-known in the art and include, but are not limited to, polymerase chain reaction (PCR), TMA, rolling circle amplification, nucleic acid sequence based amplification (NASBA), and strand displacement amplification (SDA).'), it would have been obvious to one of ordinary skill in the art that a strand displacement DNA polymerase could be used for the strand displacement amplification. Further, it would have been obvious that nucleic acid could be extracted from the test sample using routine procedures, to provide polynucleotide substrate for the PCR test.

10

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

20

Therefore, Group I+ and II+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

NOTE, Claim 3 drafted as dependent of the method of claim 2 is objected to for improper antecedent because claim 2 recites a composition, not a method. For this application, claim 3 is reconstructed as though dependent on the composition of claim 2.

30

40

50

## フロントページの続き

(32)優先日 令和1年7月26日(2019.7.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

## 1. T W E E N

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ディデント アンドレア シー .

アメリカ合衆国 9 4 0 2 5 カリフォルニア州 メンロ パーク コンスティチューション ドライブ  
2 3 0 タリス バイオメディカル コーポレーション内

(72)発明者 マーマー ヘディア

アメリカ合衆国 9 4 0 2 5 カリフォルニア州 メンロ パーク コンスティチューション ドライブ  
2 3 0 タリス バイオメディカル コーポレーション内

(72)発明者 バナッタ ダナ ケリー

アメリカ合衆国 9 4 0 2 5 カリフォルニア州 メンロ パーク コンスティチューション ドライブ  
2 3 0 タリス バイオメディカル コーポレーション内F ターム (参考) 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ06 QQ42 QQ52 QR08 QR55 QR62 QS24  
QS34 QX02