

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7542546号
(P7542546)

(45)発行日 令和6年8月30日(2024.8.30)

(24)登録日 令和6年8月22日(2024.8.22)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 Q	1/6888(2018.01)	C 1 2 Q	1/6888	Z Z N A
C 1 2 Q	1/6851(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851	Z
C 1 2 Q	1/6853(2018.01)	C 1 2 Q	1/6853	Z
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z
C 1 2 Q	1/70 (2006.01)	C 1 2 Q	1/70	
請求項の数 20 (全89頁)				
(21)出願番号	特願2021-547055(P2021-547055)	(73)特許権者	500169900	
(86)(22)出願日	令和1年10月22日(2019.10.22)		ジェン・プローブ・インコーポレーテッ ド	
(65)公表番号	特表2022-508954(P2022-508954 A)		アメリカ合衆国カリフォルニア州9 2 1 2 1, サン・ディエゴ, ジェネティック ・センター・ドライブ 1 0 2 1 0	
(43)公表日	令和4年1月19日(2022.1.19)	(74)代理人	100078282	
(86)国際出願番号	PCT/US2019/057383		弁理士 山本 秀策	
(87)国際公開番号	WO2020/086546	(74)代理人	100113413	
(87)国際公開日	令和2年4月30日(2020.4.30)		弁理士 森下 夏樹	
審査請求日	令和4年10月14日(2022.10.14)	(72)発明者	シャー, アンクル	
(31)優先権主張番号	62/748,998		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 1, サンディエゴ, ストニー リ ッジ アベニュー 1 0 5 6 0	
(32)優先日	平成30年10月22日(2018.10.22)	(72)発明者	ヤーダヴ, メグナ	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトポリオーマウイルス B K ウイルスを増幅、検出または定量化するための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

B K ポリオーマウイルス (B K V) 核酸配列を増幅および検出するための組み合わせ物であって、前記組み合わせ物が、1つまたは複数の第1の増幅プライマーと、1つまたは複数の第2の増幅プライマーと、プローブオリゴヌクレオチドとを含み、

a) 第1の増幅プライマーが、配列番号13のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号14のヌクレオチド配列を含む、

b) 第1の増幅プライマーが、配列番号1のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号2のヌクレオチド配列を含む、

c) 第1の増幅プライマーが、配列番号4のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号5のヌクレオチド配列を含む、

d) 第1の増幅プライマーが、配列番号7のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号9のヌクレオチド配列を含む、

e) 第1の増幅プライマーが、配列番号10のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号12のヌクレオチド配列を含む、

f) 第1の増幅プライマーが、配列番号16のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号18のヌクレオチド配列を含む、

g) 第1の増幅プライマーが、配列番号21のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号19のヌクレオチド配列を含む、

h) 第1の増幅プライマーが、配列番号24のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プ

ライマーが、配列番号 22 のヌクレオチド配列を含む、または

i) 第 1 の増幅プライマーが、配列番号 25 のヌクレオチド配列を含み、第 2 の増幅プライマーが、配列番号 26 のヌクレオチド配列を含み、

前記プローブオリゴヌクレオチドが、配列番号 3、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 11、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 20、配列番号 23、および配列番号 27 からなる群から選択される配列からなるヌクレオチド配列を含み、前記プローブオリゴヌクレオチドが、少なくとも 1 つの検出可能な標識に結合されている、組み合わせ物。

【請求項 2】

前記第 1 の増幅プライマーおよび／または前記第 2 の増幅プライマーが、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の組み合わせ物。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、または 5'-メチル-2'-デオキシシトシンを含む、請求項 2 に記載の組み合わせ物。

【請求項 4】

3'末端シトシンが存在する場合を除いて、前記第 1 の増幅プライマーおよび／または前記第 2 の増幅プライマー中のすべてのシトシンが 5'-メチル-2'-デオキシシトシンである、請求項 3 に記載の組み合わせ物。

【請求項 5】

a) 前記第 1 の増幅プライマーが、配列番号 13 のヌクレオチド配列を含み、前記 1 つまたは複数の第 2 の増幅プライマーが、配列番号 36 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、配列番号 37 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、を含む、

b) 前記 1 つまたは複数の第 1 の増幅プライマーが、配列番号 34 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、配列番号 35 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、を含み、前記第 2 の増幅プライマーが、配列番号 14 のヌクレオチド配列を含む、

c) 前記 1 つまたは複数の第 1 の増幅プライマーが、配列番号 34 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、配列番号 35 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、を含み、前記 1 つまたは複数の第 2 の増幅プライマーが、配列番号 36 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、配列番号 37 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、を含む、

d) 前記第 1 の増幅プライマーが、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含み、前記 1 つまたは複数の第 2 の増幅プライマーが、配列番号 28 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、配列番号 29 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、を含む、

e) 前記第 1 の増幅プライマーが、配列番号 10 のヌクレオチド配列を含み、前記 1 つまたは複数の第 2 の増幅プライマーが、配列番号 32 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、配列番号 33 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、を含む、

f) 前記 1 つまたは複数の第 1 の増幅プライマーが、配列番号 30 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、配列番号 31 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、を含み、前記第 2 の増幅プライマーが、配列番号 12 のヌクレオチド配列を含む、

g) 前記 1 つまたは複数の第 1 の増幅プライマーが、配列番号 30 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、配列番号 31 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、を含み、前記 1 つまたは複数の第 2 の増幅プライマーが、配列番号 32 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、配列番号 33 のヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つの増幅プライマーと、を含む、

h) 前記 1 つまたは複数の第 1 の増幅プライマーが、配列番号 38 のヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、配列番号39のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、を含み、前記第2の増幅プライマーが、配列番号18のヌクレオチド配列を含む、

i) 前記第1の増幅プライマーが、配列番号21のヌクレオチド配列を含み、前記1つまたは複数の第2の増幅プライマーが、配列番号40のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、配列番号41のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、を含む、

j) 前記1つまたは複数の第1の増幅プライマーが、配列番号42のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、配列番号43のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、を含み、前記第2の増幅プライマーが、配列番号19のヌクレオチド配列を含む、

10

k) 前記1つまたは複数の第1の増幅プライマーが、配列番号42のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、配列番号43のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、を含み、前記1つまたは複数の第2の増幅プライマーが、配列番号40のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、配列番号41のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、を含む、

l) 前記1つまたは複数の第1の増幅プライマーが、配列番号46のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、配列番号47のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、を含み、前記第2の増幅プライマーが、配列番号22のヌクレオチド配列を含む、または

20

m) 前記第1の増幅プライマーが、配列番号25のヌクレオチド配列を含み、前記1つまたは複数の第2の増幅プライマーが、配列番号48のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、配列番号49のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項6】

前記プローブオリゴヌクレオチドが少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項7】

前記修飾ヌクレオチドが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、または5'-メチル-2'-デオキシシトシンを含む、請求項6に記載の組み合わせ物。

30

【請求項8】

前記プローブオリゴヌクレオチドが、2、3、4、5、6、7または8個の5'-メチル-2'-デオキシシトシンを含む、請求項7に記載の組み合わせ物。

【請求項9】

前記プローブオリゴヌクレオチド中のすべてのシトシンが、5'-メチル-2'-デオキシシトシンである、請求項8に記載の組み合わせ物。

【請求項10】

前記検出可能な標識が、プローブオリゴヌクレオチドの5'または3'末端に結合した蛍光分子を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

40

【請求項11】

前記蛍光分子がプローブオリゴヌクレオチドの5'末端に結合し、クエンチャーが前記プローブオリゴヌクレオチドの3'末端に結合している、請求項10に記載の組み合わせ物。

【請求項12】

前記プローブオリゴヌクレオチドが加水分解プローブである、請求項10または11に記載の組み合わせ物。

【請求項13】

請求項1～12のいずれか一項に記載の1つまたは複数の第1の増幅プライマー、1つまたは複数の第2の増幅プライマー、およびプローブオリゴヌクレオチドを備える、BKV核酸配列を増幅するためのキット。

50

【請求項 14】

前記増幅プライマーおよび前記プローブオリゴヌクレオチドが単一の容器または別個の容器で提供される、請求項 13 に記載のキット。

【請求項 15】

前記キットが、少なくとも 1 つの反応混合物をさらに含み、前記少なくとも 1 つの反応混合物が、1 つまたは複数の DNA ポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、陽性コントロール核酸、陰性コントロール核酸、内部コントロール核酸、コントロール増幅プライマー、コントロールプローブオリゴヌクレオチド、KCl、MgCl₂、酢酸カリウム、緩衝液、BSA、スクロース、トレハロース、DMSO、ベタイン、ホルムアミド、グリセロール、ポリエチレングリコール、非イオン性洗浄剤、アンモニウムイオン、および EDTA を含む、請求項 13 または 14 に記載のキット。

10

【請求項 16】

使用説明書をさらに備える、請求項 13 ～ 15 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 17】

i) B K V 核酸配列を含むまたは含むと疑われるサンプルを請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の 1 つまたは複数の第 1 の増幅プライマーおよび 1 つまたは複数の第 2 の増幅プライマーと接触させることと、

ii) インビトロ核酸増幅反応を実施することとであって、前記サンプルに存在する任意の B K V 核酸配列が、増幅産物を生成するための鋳型として使用される、ことと、

iii) 請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載のプローブオリゴヌクレオチドを使用して前記増幅産物の存在または不在を検出し、それにより、前記サンプル中の前記 B K V 核酸の存在または不在を示すことと、

20

を含む、B K V 核酸配列を検出する方法。

【請求項 18】

核酸増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記増幅産物の存在または不在を検出することが、前記プローブオリゴヌクレオチドからのシグナルを定量化することを含む、請求項 17 または 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記検出することがリアルタイムで分析される、請求項 17 ～ 19 のいずれか一項に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

この出願は、参照により本明細書に組み込まれる、2018 年 10 月 22 日に提出された米国仮出願番号第 62/748,998 号の優先権を主張する。

【0002】

配列表

出願された 537958__SeqListing__ST25.txt に記述された配列表は、サイズが 18 キロバイトであり、2019 年 9 月 24 日に作成され、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【背景技術】

【0003】

ヒトポリオーマウイルス B K ウイルス (B K V) はポリオーマウイルスファミリーのメンバーである。B K ウイルスは J C ウイルス (J C V) と呼ばれる別のウイルスに類似しており、75% のゲノム配列類似性を共有している。B K V には、約 5000 塩基対の二本鎖 DNA 環状ゲノムがある。人口の最大 80% がこのウイルスの潜伏型を含有していると考えられており、体が何らかの形の免疫抑制を受けるまで潜伏したままである。ウイルスの検出は、腎臓および多臓器移植患者にとって特に重要であり、臨床症状には腎機能障

50

害が含まれる。腎移植患者の1～10%がBKV関連腎症（BKVAN）に進行し、これらの患者の最大80%が移植片を失う。BKVは、尿管狭窄および間質性腎炎にも関連している。骨髄移植レシピエントでは、BKVは出血性膀胱炎を引き起こす可能性がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

サンプル中のヒトポリオーマウイルスBKウイルス（BKV）を検出および／または定量するための、またはBKV核酸配列を増幅するための増幅オリゴヌクレオチド、核酸、方法、組成物、およびキットが記載されている。増幅オリゴヌクレオチドには、増幅プライマー（第1の増幅プライマーと第2の増幅プライマーまたは第1のプライマーと第2のプライマー）が含まれる。増幅オリゴヌクレオチドは、増幅された配列の検出を容易にするプローブオリゴヌクレオチドをさらに含む。本方法は、ウイルス核酸を増幅して、サンプル中のBKV標的配列を検出することを伴う。本方法は、高感度のBKVの検出を有利に提供することができる。

【0005】

増幅オリゴヌクレオチドは、当該技術分野で既知の様々な核増幅方法を使用して、BKV配列の増幅、検出、および／または定量化に使用することができる。核酸増幅方法は、熱サイクリングを使用することができ、またはそれらは、等温であってもよい。当該技術分野で既知の核酸増幅方法には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写酵素PCR（RT-PCR）、リアルタイムPCR、核酸配列ベースの増幅（NASBA）、レプリカーゼ媒介増幅（Q β -レプリカーゼ媒介増幅を含む）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、および鎖置換増幅（SDA）が含まれるが、これらに限定されない。

【0006】

記載される増幅オリゴヌクレオチドを、BKV配列を増幅および／または検出するために使用することができる。増幅されたBKV配列であるアンプリコンは、配列番号50に存在する配列および／またはその相補体を含む。いくつかの実施形態において、増幅されたBKV配列であるアンプリコンは、配列番号51に存在する配列および／またはその相補体を含む。いくつかの実施形態において、増幅されたBKV配列であるアンプリコンは、配列番号52に存在する配列および／またはその相補体を含む。いくつかの実施形態において、増幅オリゴヌクレオチドは、配列番号50の一部、および／またはその相補体を含むBKV VP2アンプリコンを増幅し、必要に応じて検出するように構成される。いくつかの実施形態において、増幅オリゴヌクレオチドは、配列番号51の一部、および／またはその相補体を含むBKV VP2アンプリコンを増幅し、必要に応じて検出するように構成される。いくつかの実施形態において、増幅オリゴヌクレオチドは、配列番号52の一部、および／またはその相補体を含むBKVアンプリコンを増幅し、必要に応じて検出するように構成される。当該技術分野の様々な方法を使用して、BKVアンプリコンを検出することができる。

【0007】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号50もしくはその相補体、配列番号51もしくはその相補体、および／または配列番号52もしくはその相補体に存在するヌクレオチド配列に対して少なくとも90%の同一性を有する18～30個の連続するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10、配列番号13、配列番号16、配列番号21、配列番号24、配列番号25、配列番号30、配列番号31、配列番号34、配列番号35、配列番号38、配列番号39、配列番号42、配列番号43、配列番号46、または配列番号47からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。第1の増幅プライマーは、配列番号50、配列番号51、および／または配列番号52にハイブリダイズし、DNA重合を開始することができる。

【0008】

いくつかの実施形態において、第2の増幅プライマーは、配列番号50もしくはその相補体、配列番号51もしくはその相補体、および／または配列番号52もしくはその相補体に存在するヌクレオチド配列に対して少なくとも90%の同一性を有する19～30個の連続するヌクレオベースを含む。いくつかの実施形態において、第2の増幅プライマーは、配列番号2、配列番号5、配列番号9、配列番号12、配列番号14、配列番号18、配列番号19、配列番号22、配列番号26、配列番号28、配列番号29、配列番号32、配列番号33、配列番号36、配列番号37、配列番号40、配列番号41、配列番号44、配列番号45、配列番号48、または配列番号49からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。第2の増幅プライマーは、配列番号50もしくはその相補体、配列番号51もしくはその相補体、および／または配列番号52もしくはその相補体にハイブリダイズし、DNA重合を開始することができる。

10

【0009】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10、配列番号13、配列番号16、配列番号21、配列番号24、配列番号25、配列番号30、配列番号31、配列番号34、配列番号35、配列番号38、配列番号39、配列番号42、配列番号43、配列番号46、または配列番号47からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して0、1または2個のミスマッチを有するヌクレオチド配列を含む。

【0010】

20

いくつかの実施形態において、第2の増幅プライマーは、配列番号2、配列番号5、配列番号9、配列番号12、配列番号14、配列番号18、配列番号19、配列番号22、配列番号26、配列番号28、配列番号29、配列番号32、配列番号33、配列番号36、配列番号37、配列番号40、配列番号41、配列番号44、配列番号45、配列番号48、または配列番号49からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して0、1、または2個のミスマッチを有するヌクレオチド配列を含む。

【0011】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、第1のBKV核酸配列にハイブリダイズし、第2の増幅プライマーは、第2のBKV核酸配列にハイブリダイズする。第1および第2のBKV核酸配列は、配列番号50またはその相補体に存在するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、第1および第2のBKV核酸配列は、配列番号51またはその相補体に存在するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、第1および第2のBKV核酸配列は、配列番号52またはその相補体に存在するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、第1のBKV核酸配列に対して80%～100%相補的であり、第2の増幅プライマーは、第2のBKV核酸配列に対して80%～100%相補的である。いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、第1のBKV核酸配列に対して90%～100%相補的であり、第2の増幅プライマーは、第2のBKV核酸配列に対して90%～100%相補的である。いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、第1のBKV核酸配列に対して>90%かつ<100%相補的であり、第2の増幅プライマーは、第2のBKV核酸配列に対して>90%かつ<100%相補的である。

30

40

【0012】

記載されるプローブオリゴヌクレオチドを使用して、BKVアンプリコンを含むがこれに限定されないBKV核酸を検出することができる。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、配列番号50もしくはその相補体、配列番号51もしくはその相補体、および／または配列番号52もしくはその相補体に存在するヌクレオチド配列に対して少なくとも90%の同一性を有する21～30個の連続するヌクレオベースを含む。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、配列番号50もしくはその相補体、配列番号51もしくはその相補体、および／または配列番号52もしくはその相補体にハイブリダイズする21～30個の連続するヌクレオベースを含む。

50

【0013】

いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、配列番号3、配列番号6、配列番号8、配列番号11、配列番号15、配列番号17、配列番号20、配列番号23、および配列番号27からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、配列番号3、配列番号6、配列番号8、配列番号11、配列番号15、配列番号17、配列番号20、配列番号23、および配列番号27からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して0、1、または2個のミスマッチを有するヌクレオチド配列を含む。

【0014】

いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、第3のBKV核酸配列にハイブリダイズする。第3のBKV核酸配列は、配列番号50またはその相補体に存在するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、第3のBKV核酸配列は、配列番号51またはその相補体に存在するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、第3のBKV核酸配列は、配列番号52またはその相補体に存在するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、第3のBKV核酸配列に対して80%~100%相補的である。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、第3のBKV核酸配列に対して90%~100%相補的である。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、第3のBKV核酸配列に対して>90%かつ<100%相補的である。

【0015】

プローブオリゴヌクレオチドは、1種以上の検出可能なマーカーまたは標識を含むことができる。検出可能なマーカーは、蛍光分子であり得るが、これに限定されない。蛍光分子は、プローブオリゴヌクレオチドの5'もしくは3'末端、またはオリゴマーに沿った任意の場所に結合することができる。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、分子ビーコンまたはトーチであり得る。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、加水分解プローブであり得る。プローブオリゴヌクレオチドは、プローブオリゴヌクレオチドの5'末端に結合した蛍光分子およびプローブオリゴヌクレオチドの3'末端に結合したクエンチャーを含むことができるか、または蛍光分子をプローブオリゴヌクレオチドの3'末端に結合することができ、クエンチャーをプローブオリゴヌクレオチドの5'末端に結合することができる。

【0016】

記載される増幅オリゴヌクレオチド（例えば、増幅プライマーまたはプローブオリゴヌクレオチド）のいずれも、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含むことができる。修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、または5-メチルシトシンであり得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、増幅オリゴヌクレオチドは、2つ以上の修飾ヌクレオチドを含む。2つ以上の修飾ヌクレオチドは、同じ修飾を有しても、異なる修飾を有してもよい。いくつかの実施形態において、記載される増幅オリゴヌクレオチドのいずれかは、1つ以上の5-メチルシトシンを含み得る。5-メチルシトシンには、5-メチル-デオキシシトシン（5-Me-dC、5-メチル-2'-デオキシシトシン）が含まれる。増幅オリゴヌクレオチドは、0、1、2、3、4、5、6、7、8個、またはそれ以上の2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾オリゴヌクレオチド、5-メチルシトシン、またはそれらの組み合わせを有し得る。いくつかの実施形態において、増幅オリゴヌクレオチド中のすべてのシトシンヌクレオチドは、5-メチルシトシン修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、5'-メチル-2'-デオキシシトシン塩基を使用して、対応する非メチル化オリゴマーと比較して、オリゴマーに組み込まれた各5'-メチル-2'-デオキシシトシンのTmを約0.5℃~1.3℃上げることによって、二本鎖の安定性を増加させることができる。

【0017】

記載される増幅プライマーまたはプローブオリゴヌクレオチドのいずれも、少なくとも

10

20

30

40

50

縮重位置を含むことができる。縮重位置は、複数の可能な選択肢を持つことができるヌクレオベース配列の位置を指す。いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマー、第2の増幅プライマー、および／またはプローブオリゴヌクレオチドは、0、1、2、3、4、または5個の縮重位置を含む。縮重位置は、R（AまたはG）、W（AまたはT）、M（AまたはC）、Y（CまたはT）、K（GまたはT）、B（AまたはGまたはT）、D（AまたはGまたはT）、H（AまたはCまたはT）、N（AまたはGまたはCまたはT）、S（GまたはC）、またはV（AまたはCまたはG）であり得るが、これらに限定されない。2つ以上の縮重位置を有するオリゴヌクレオチドの場合、任意の所与の位置での縮重は、別の位置での縮重とは無関係である。

【0018】

記載される増幅プライマーは、BKV配列を増幅するために使用することができる。いくつかの実施形態において、BKV配列は、VP2配列を含む。いくつかの実施形態において、BKV配列は、LT配列を含む。いくつかの実施形態において、記載される増幅プライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの熱サイクリング反応を使用してBKV配列を増幅することができる。いくつかの実施形態において、記載される増幅プライマーを使用して、転写媒介増幅（TMA）などの等温反応を使用してBKV配列を増幅することができる。記載される増幅オリゴヌクレオチドを利用することができる他の核酸増幅方法としては、核酸配列ベースの増幅（NASBA）、レプリカーゼ媒介増幅、リガーゼ連鎖反応（LCR）、鎖置換増幅（SDA）、逆転写酵素PCR（RT-PCR）、およびリアルタイムPCRが挙げられるが、これらに限定されない。

【0019】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、第2の増幅プライマーと組み合わせられて、増幅プライマー対を形成する。いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーおよび第2の増幅プライマーは、長さが約100～約150ヌクレオチド（塩基対）のBKV核酸配列を増幅するように構成される。いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーおよび第2の増幅プライマーは、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、または150ヌクレオチド（塩基対）の長さのBKV核酸配列を増幅する（すなわち、BKVアンプリコンを生成する）ように構成される。

【0020】

BKV、BKV核酸、またはBKV核酸に由来する核酸を増幅、検出および／または定量化するための組成物およびキットが記載されている。いくつかの実施形態において、記載される組成物およびキットは、直接的、迅速、特異的、および／または高感度のBKV検出を提供する。組成物およびキットは、1つ以上の記載される増幅オリゴヌクレオチドおよび／またはプローブオリゴヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態では、組成物またはキットは、少なくとも1つの第1の増幅プライマーおよび少なくとも1つの第2の増幅プライマーを含む。組成物またはキットは、少なくとも1つのプローブオリゴヌクレオチドをさらに含み得る。組成物またはキットは、1つ以上のBKV陽性対照核酸、陰性対照核酸、ヌクレオチド三リン酸、DNAポリメラーゼ、サンプル輸送培地、および使用説明書のいずれかをさらに含み得る。

【0021】

BKV標的配列を増幅、検出、および／または定量化するための方法が記載されており、この方法は、BKV、BKV核酸、またはBKVに由来する核酸を含むまたは含むと疑われるサンプルを、BKVの標的核酸を増幅するための少なくとも2つの増幅プライマーと接触させる工程を含み、この少なくとも2つの増幅プライマーは、それぞれがBKV核酸配列にハイブリダイズする上記の第1の増幅プライマーおよび第2の増幅プライマーを

10

20

30

40

50

含む。インビトロ核酸増幅反応であって、任意のBKV標的核酸が、サンプルに存在する場合に増幅産物を生成するための鋳型として使用される、反応が実施される。いくつかの実施形態において、第1および第2の増幅プライマーはそれぞれ、配列番号50またはその相補体にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、第1および第2の増幅プライマーはそれぞれ、配列番号51またはその相補体にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、第1および第2の増幅プライマーはそれぞれ、配列番号52またはその相補体にハイブリダイズする。

【0022】

いくつかの実施形態では、本方法は、増幅産物の存在または不在を検出し、それにより、サンプル中のBKVの存在または不在を示すことをさらに含む。増幅産物は、プローブオリゴヌクレオチドを使用して検出される。記載されるプローブオリゴヌクレオチドを増幅反応において使用して、サンプル中のBKVを検出および／または定量化することができる。

10

【0023】

いくつかの実施形態において、サンプル中のBKVの定量化を使用して、実質臓器移植レシピエントの管理を助けることができる。抗BKV療法を受けている患者では、BKVのDNA測定を使用して、治療に対するウイルス応答を評価することができる。ウイルス負荷情報を使用して、移植患者におけるBKV疾患を診断することもできる。

【発明を実施するための形態】

【0024】

20

A. 定義

本教示を詳細に記載する前に、本開示が特定の組成物または処理工程に限定されず、それらは変化し得ることを理解されたい。本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」には、文脈で別段の明確な指示がない限り、複数の指示対象を含むことに留意されたい。そのため、例えば、「1つのオリゴマー」への言及は、複数のオリゴマーなどを含む。接続詞「または」は、包括的な意味が文脈において不当でない限り、包括的な意味で、すなわち、「および／または」と同等であると解釈されるものである。

【0025】

一般に、「約」という用語は、組成物の活性または安定性に著しい影響を及ぼさない組成物の成分の量のごくわずかな変動を示す。明細書がパラメータの特定の値を開示している場合、明細書は、代わりに「約」その値のパラメータを開示していると理解されるべきである。すべての範囲は、示される範囲内の任意の引用される数字（分数または整数）、および「エンドポイントを含まない」などの明示的な除外がない場合の範囲のエンドポイントを含むものと解釈され、したがって、例えば、「10～15」には、値10および15と、10から15までの整数および小数（例えば、12.67）とが含まれる。また、「含む、備える(comprise)」、「含む、備える(comprises)」、「含むこと、備えること(comprising)」、「含む、含有する(contains)」、「含む、含有する(containing)」、「含む(include)」、「含む(includes)」、および「含むこと(including)」の使用は、限定を意図するものではない。上記の概要および詳細な説明は両方とも、例示的かつ説明的なものにすぎず、教示を限定するものではないことを理解されたい。参照により組み込まれるいかなる資料の範囲も本開示の明示的内容と矛盾する限りにおいて、明示的内容が優先する。

30

40

【0026】

別段の明示がない限り、様々な成分を「含む」と記載する本明細書の実施形態はまた、記載される成分「からなる」またはそれ「から本質的になる」として企図される。様々な成分「から本質的になる」と記載する本明細書の実施形態はまた、記載される成分「からなる」として企図される。「から本質的になる」は、本明細書に記載の組成物および方法の基本的かつ新規の特徴を実質的に変化させない追加の成分（複数可）、組成物（複数可

50

）、または方法の工程（複数可）が、それらの組成物または方法に含まれ得ることを意味する。そのような特徴には、BKV核酸を他の既知の病原体から区別する特異性で、必要に応じて、検出される増幅されたウイルス配列を作製する増幅反応の開始から約45分以内に約1～100コピーのウイルスを検出することができる感度で、サンプルに存在するBKV核酸配列を検出する能力が含まれる。

【0027】

「サンプル」は、BKV、BKV核酸、および／またはBKV若しくはBKV核酸に由来する核酸を含むか、または含むことが疑われる任意のサンプルである。「サンプル」は、BKV、または核酸もしくは核酸の断片などのその成分を含有するものであっても、または含有することが疑われるものであってもよい。サンプルは、成分の複雑な混合物であり得る。サンプルには、例えば、下気道検体、気管支肺胞洗浄液検体、痰、気管吸引物、血液、血漿、血清、血球、唾液、および粘膜、脳脊髄液（中枢神経系のBKV感染症を診断するため）、ならびに生殖器病変、肛門生殖器病変、口腔病変、粘膜皮膚病変、皮膚病変および眼病変またはそれらの組み合わせからのまたはそれらに由来する生検などのサンプルを含む、生きている若しくは死んだ哺乳動物、または生物に由来する任意の組織または材料を含む、生物学的サンプル、または臨床サンプルもしくは検体が含まれる。サンプルは、例えば、培養培地中の細胞および組織の増殖から生じる馴化培地を含む、インビトロ細胞培養成分のサンプルも含み得る。組織または細胞構造を物理的、化学的、または機械的に破壊して、酵素、緩衝液、塩、洗浄剤などを含有し得る溶液中に細胞内核酸を放出するようにサンプルを処理して、分析用サンプルを調製してもよい。また、いくつかの実施形態において、サンプルは、サンプルを濾過装置上を通過させたり、濾過装置を通過させたりして得られたもの、または遠心分離に続いて得られたもの、あるいは媒質、マトリックス、もしくは支持体に付着させて得られたものなどの加工済みサンプルを含み得る。

【0028】

「核酸」および「ポリヌクレオチド」とは、従来のRNA、DNA、混合RNA-DNA、およびそれらの類縁体であるポリマーを含むポリヌクレオチドを形成するために一緒に連結された窒素複素環塩基または塩基類縁体を有するヌクレオシドまたはヌクレオシド類縁体を含む多量体化合物を指す。核酸の「主鎖」は、1種以上の糖-ホスホジエステル結合、ペプチド-核酸結合（「ペプチド核酸」もしくはPNA；国際出願WO95/32305号）、ホスホロチオエート結合、メチルホスホン酸結合、またはこれらの組み合わせを含む、様々な結合から構成され得る。核酸の糖部分は、リボース、デオキシリボース、または置換、例えば、2'メトキシもしくは2'ハロゲン化物置換を有する同様の化合物であり得る。窒素塩基は、従来の塩基（A、G、C、T、U）、それらの類縁体（例えば、イノシンまたは他のもの、The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36, Adams et al., ed., 11th ed., 1992を参照されたい）、プリンまたはピリミジンの誘導体（例えば、N⁴-メチルデオキシングアノシン、デアザプリンもしくはアザプリン、デアザピリミジンもしくはアザピリミジン、5もしくは6位に置換基を有するピリミジン塩基、2、6、もしくは8位に置換基を有するプリン塩基、2-アミノ-6-メチルアミノプリン、5-メチルシトシン、O⁶-メチルグアニン、4-チオ-ピリミジン、4-アミノ-ピリミジン、4-ジメチルヒドラジン-ピリミジン、ならびにO⁴-アルキル-ピリミジン（米国特許第5,378,825号および国際出願WO93/13121号）であり得る。核酸は、主鎖がポリマーの位置（複数可）に窒素塩基を含まない、1つ以上の「脱塩基性」残基を含み得る（米国特許第5,585,481号）。核酸は、従来のRNAまたはDNAの糖、塩基、および結合のみを含んでもよく、従来の構成要素および置換基の両方を含んでもよい（例えば、2'メトキシ結合を有する従来の塩基、または従来の塩基および1つ以上の塩基類縁体を含むポリマー）。核酸は、糖立体配置を模倣するRNA中にロックされた二環式フラノース単位を有する1つ以上のLNAヌクレオチドモノマーを含有する類縁体である「ロックド核酸」（LNA）を含み、これは相補的RNAおよびDNA配列に対するハイブリダイゼーションの親和性を増強する（Vester and Wengel, 2004, Bi

10

20

30

40

50

ochemistry 43 (42) : 13233-41)。核酸は、核酸の機能または挙動を変化させるための修飾塩基、例えば、さらなるヌクレオチドが核酸に付加されるのを阻止するための3'-末端ジデオキシヌクレオチドの付加を含み得る。ハイブリダイゼーション複合体の安定性に影響を及ぼし得るオリゴマーの実施形態には、PNAオリゴマー、2'-メトキシもしくは2'-フルオロ置換RNAを含むオリゴマー、またはハイブリダイゼーション複合体の全電荷、電荷密度、もしくは立体会合(steric association)に影響を及ぼすオリゴマー(荷電した結合(例えば、ホスホロチオエート)もしくは中性基(例えば、メチルホスホネート)を含有するオリゴマーを含む)が含まれる。オリゴヌクレオチド、アンプリコン、または他の核酸の長さに関する範囲に言及する場合、その範囲はすべての整数を含む(例えば、19~25個の連続したヌクレオチド長には、19個、20個、21個、22個、23個、24個、および25個が含まれる)ことが理解される。

【0029】

「標的核酸」または「標的」は、標的核酸配列を含有する核酸である。「標的核酸配列」、「標的配列」または「標的領域」は連続したヌクレオチド配列であり、増幅オリゴヌクレオチドはアニーリングし、増幅および／または検出される、BKVなどの標的生物のヌクレオチド配列を含む。標的配列またはその相補体は、標的核酸の増幅および／または検出に使用される増幅プライマー、および／または検出プローブにハイブリダイズする配列を含む。標的核酸は、増幅されなくてもよい標的配列以外の他の配列を含んでもよい。標的核酸は、DNAまたはRNAであってもよく、一本鎖または二本鎖のいずれかであってもよい。標的核酸は、ゲノム核酸、rRNAなどの転写された核酸、またはゲノム核酸もしくは転写された核酸に由来する核酸であり得るが、これらに限定されない。フォワード増幅プライマーとリバース増幅プライマーの間の隣接するヌクレオチド配列は、増幅されるポリヌクレオチドを定義する。

【0030】

別の指示がない限り、「BKV核酸にハイブリダイズすること」は、BKV核酸のセンスもしくはアンチセンス鎖のいずれか、またはゲノム配列から転写されたRNAにハイブリダイズすることを含む。

【0031】

いくつかの実施形態において、増幅オリゴヌクレオチド、増幅プライマー、プローブオリゴヌクレオチド、または標的捕捉オリゴマーは、1種以上の修飾ヌクレオチドを含む。増幅オリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8個またはそれ以上の修飾ヌクレオチドを有し得る。修飾ヌクレオチドには、修飾ヌクレオベースを有するヌクレオチドが含まれる。修飾ヌクレオベースには、合成および天然のヌクレオベース、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、ならびにN-2、N-6、およびO-6置換プリンが含まれるが、これらに限定されない。修飾ヌクレオチドには、2'修飾ヌクレオチド(2'-O-メチルヌクレオチド、および2'-フルオロヌクレオチドなどの2'-ハロゲンヌクレオチドを含むがこれらに限定されない)を含むがこれらに限定されない、修飾塩基を有するヌクレオチドも含まれる。

【0032】

「C残基」は、文脈に別段の指示がない限り、メチル化(例えば、5-メチルシトシン)および非メチル化シトシンを含む。

【0033】

「RNAおよびDNA等価物」とは、本質的に同じ相補的塩基対ハイブリダイゼーション特性を有するRNAおよびDNA分子を意味する。RNAおよびDNA等価物は、異なる糖部分(すなわち、リボース対デオキシリボース)を有し、RNA中のウラシルおよびDNA中のチミンの存在によって異なり得る。等価物は特定の配列に対して同程度の相補性を有するので、RNA等価物とDNA等価物との間の相違は相同性の相違には寄与しない。RNAおよびDNAの等価物は、DNAのTがRNAのUに置き換えられていることを除いて、同じ塩基配列を持つ分子である。

【0034】

「オリゴマー」または「オリゴヌクレオチド」は、一般に1,000ヌクレオチド(n t)未満の核酸を指し、約2~5 n tの下限および約500~900 n tの上限を有するサイズ範囲のものを含む。いくつかの実施形態において、オリゴマーは、約15、16、17、18、19、または20 n tの下限および約30~60 n tの上限を有するサイズ範囲を有する。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、最大30、35、40、45、50、55、または60 n tを有する。オリゴマーは、天然に存在する供給源から精製されてもよく、または任意の周知の酵素的もしくは化学的方法を使用することによって合成されてもよい。オリゴマーは、機能名(例えば、第1の増幅プライマー、第2の増幅プライマー、プロモータープライマー、プローブオリゴヌクレオチド、ヘルパーオリゴマー、ディスプレイサーオリゴマー、および標的捕捉オリゴマー)によって参照され得るが、当業者は、そのような用語がオリゴマーを指すことを理解するであろう。

10

【0035】

2つのヌクレオチド配列のアラインメントに関して、「ミスマッチ」は、2つの配列間のヌクレオチドの違いである。ミスマッチは、(あるヌクレオベースから別のヌクレオベースへの)置換、挿入、または欠失である可能性がある。ハイブリダイゼーションに関して、「ミスマッチ」は、非ワトソンクリック塩基対を指す。

【0036】

「アンプリコン」または「増幅産物」とは、核酸増幅反応において生成され、かつ標的核酸に由来する核酸分子を意味する。アンプリコンまたは増幅産物は、標的核酸と同じか、またはそれとは反対方向のものであり得る標的核酸配列を含有する。アンプリコンは一本鎖または二本鎖であり得る。

20

【0037】

「増幅プライマー」は、標的核酸またはその相補体にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを指し、核酸増幅反応に関与する。増幅プライマーはテンプレート核酸にハイブリダイズし、重合によって伸長できる3'-OH(3'-ヒドロキシル)基を持っている。いくつかの実施形態において、増幅プライマーは一本鎖である。いくつかの実施形態において、増幅プライマーは実質的に一本鎖であり、5個以下の連続した塩基対の自己相補的領域を含む。いくつかの実施形態において、増幅プライマーは15~60、15~55、15~50、15~45、15~40、15~35、15~30の長さのヌクレオベースである。いくつかの実施形態において、増幅プライマーは、長さが18~30ヌクレオベースである。いくつかの実施形態において、増幅プライマーは、長さが18~60ヌクレオベースであり、標的核酸配列に存在する対応する18~30ヌクレオチドオリゴハイブリダイズ配列にハイブリダイズする18~30個の連続するヌクレオベース(標的ハイブリダイズ領域)を含有する。いくつかの実施形態において、18~30個の連続するヌクレオベースは、増幅プライマーの3'末端にある。増幅プライマーは、プライマー、第1の増幅プライマー、フォワード増幅プライマー、第2の増幅プライマー、またはリバース増幅プライマーであり得る。いくつかの実施形態において、増幅プライマーは、標的核酸配列またはその相補鎖の領域に相補的な少なくとも約10個の連続塩基、および必要に応じて少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個の連続塩基を含有する。連続塩基は、増幅プライマーが結合する標的配列と少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも95%、または完全に相補的であり得る。いくつかの実施形態において、増幅オリゴマーは、標的核酸配列に相補的ではない追加の3'または5'配列を含有する。当業者は、記載された範囲がその範囲内のすべての整数および有理数(例えば、92%または98.377%)を含むことを理解するであろう。増幅プライマーは、必要に応じて、修飾ヌクレオチドおよび/または縮重位置を含み得る。いくつかの実施形態において、増幅プライマーは、少なくとも1つのメチル化シトシンおよび/または少なくとも1つの2'-修飾ヌクレオチドを含有し得る。いくつかの実施形態において、増幅プライマーは、1、2、3、4、5、6、7、または8個の2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、

30

40

50

5-メチルシトシン、またはそれらの組み合わせを含有する。増幅プライマーは、例えば、標的配列に相補的ではない5'領域を含むことによって必要に応じて修飾され得る。そのような修飾には、タグ、プロモーター、または増幅プライマーもしくは標的オリゴヌクレオチドの操作もしくは増幅に使用されるかもしくはは有用な他の配列などの機能的付加が含まれ得る。

【0038】

「核酸増幅」とは、標的核酸配列、もしくはその相補的配列、またはそれらの断片の複数のコピー（すなわち、完全標的核酸よりコピーを少なく含む増幅配列）を生成する任意のインビトロ手順を指す。核酸増幅手順の例には、転写媒介増幅（TMA）、核酸配列ベースの増幅（NASBA）、およびその他のもの（例えば、米国特許第5,399,491号、同第5,554,516号、同第5,437,990号、同第5,130,238号、同第4,868,105号、および同第5,124,246号）、レプリカーゼ媒介増幅（例えば、米国特許第4,786,600号）、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（例えば、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、および同第4,800,159号）、リガーゼ連鎖反応（LCR）（例えば、欧州特許出願第0320308号）、ならびに鎖置換増幅（SDA）（例えば、米国特許第5,422,252号）などの転写関連方法が含まれる。レプリカーゼ媒介増幅は、自己複製RNA分子、およびQ β -レプリカーゼなどのレプリカーゼを使用する。PCR増幅は、DNAポリメラーゼ、プライマー、および熱サイクリング工程を使用して、DNAまたはcDNAの2つの相補鎖の複数のコピーを合成する。LCR増幅は、少なくとも4つの別々のオリゴヌクレオチドを使用して、ハイブリダイゼーション、ライゲーション、および変性の複数サイクルを使用することによって標的配列およびその相補鎖を増幅する。SDAは、標的配列を含む半修飾DNA二本鎖の一方の鎖にニックを入れ、それに続いて一連のプライマー伸長および鎖置換工程で増幅する、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含有するプライマーを使用する。特定の実施形態はPCRまたはTMAを使用するが、本明細書に開示されるオリゴマーが他の増幅方法におけるプライマーとして容易に使用され得ることは当業者に明らかである。

【0039】

転写媒介増幅は、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオシド三リン酸、リボヌクレオシド三リン酸、プロモーター含有オリゴヌクレオチドを使用し、必要に応じて他のオリゴヌクレオチドを含み得ることで、最終的に核酸鋳型から複数のRNA転写物を生成する（Kacian et al. の米国特許第5,399,491号および同第5,554,516号、Burg et al. の米国特許第5,437,990号、Gingeras et al. の国際出願WO88/01302号および同WO88/10315号、Malek et al. の米国特許第5,130,238号、Urdea et al. の米国特許第4,868,105号および同第5,124,246号、McDonough et al. の国際出願WO94/03472号、ならびにRyder et al. の国際出願WO95/03430号に詳細に記載され、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる）。TMAを使用する方法は、以前に詳細に記載されている（米国特許第5,399,491号および同第5,554,516号、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる）。

【0040】

リアルタイムでアンプリコンを検出するサイクリック増幅方法において、「閾値サイクル」（Ct）という用語は、標的の増幅に関連するシグナルの出現時間の尺度であり、一般に正規化レポーターシグナルの標準偏差の10倍である。増幅が「閾値サイクル」に達すると、一般にプローブオリゴヌクレオチドが結合する配列の陽性の増幅産物があると考えられる。次いで、増幅産物の同一性を、ゲル電気泳動、核酸配列決定、および他のそのような周知の方法などの当業者に既知の方法によって決定することができる。

【0041】

本明細書で使用される場合、「相対蛍光単位」（「RFU」）という用語は、蛍光強度

10

20

30

40

50

の測定単位である。R F Uは、測定に使用される検出手段の特性により変化し、サンプルと対照との間の相対強度を比較するための測定として使用することができる。分析感度（検出限界またはL o D）は、50%組織培養感染量（median tissue culture infective dose）（T C I D₅₀/mL）から決定される。T C I D₅₀/mLは、播種された細胞培養物の50%において病理学的変化を生成する病原体の量である。

【0042】

「プローブオリゴヌクレオチド」、「検出プローブ」または「プローブ」は、標的核酸の検出のために、核酸ハイブリダイゼーションを促進する条件下で増幅配列を含む標的配列に特異的にハイブリダイズするオリゴマーを指す。検出は、直接的（すなわち、標的核酸配列に直接ハイブリダイズしたプローブオリゴヌクレオチド）または間接的（すなわち、プローブオリゴヌクレオチドを標的核酸配列に連結させる中間構造体にハイブリダイズしたプローブオリゴヌクレオチド）のいずれであってもよい。プローブオリゴヌクレオチドの標的配列は一般に、プローブオリゴヌクレオチドが特異的にハイブリダイズする、より大きい配列内の特異的配列を指す。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、長さが15～60、15～55、15～50、15～45、15～40、15～35、または15～30ヌクレオベースである。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、長さが20～60のヌクレオベースであり、標的核酸配列に存在する対応する20～30ヌクレオチドのオリゴハイブリダイズ配列にハイブリダイズする20～30個の連続するヌクレオベースを含有する。プローブオリゴヌクレオチドは、標的特異的配列および非標的相補的配列を含み得る。そのような非標的相補的配列には、検出および／または増幅の促進に使用することができる、ヘアピン構造などの所望の二次または三次構造を付与する配列が含まれ得る。（例えば、米国特許第5,118,801号、同第5,312,728号、同第5,925,517号、同第6,150,097号、同第6,849,412号、同第6,835,542号、同第6,534,274号、および同第6,361,945号、ならびに米国特許出願公開第20060068417A1号および同第20060194240A1号）。定義された配列のプローブオリゴヌクレオチドを、化学合成、および組換え核酸分子からのインビトロまたはインビボ発現などによる当業者に既知の技術によって生成することができる。

【0043】

「非標的特異的配列」または「非標的相補的配列」という用語は、標準的なハイブリダイゼーション条件下で、その領域が標的核酸中の相補的オリゴハイブリダイズ配列にアニーリングしないオリゴマーの領域を指す。より具体的には、非標的特異的配列は、標的核酸中のオリゴハイブリダイズ配列に隣接する標的配列に相補的ではない。そのような非標的特異的配列は、オリゴヌクレオチド中の標的特異的配列の一部に相補的であり得る。いくつかの実施形態において、非標的相補的配列は、長さが4、5、6、7、または8個のヌクレオベースである。非標的特異的配列を有するオリゴマーには、分子ビーコンが含まれるが、これらに限定されない。

【0044】

検出は、標的増幅中に存在し、アンプリコンにリアルタイムでハイブリダイズする一本鎖核酸プローブオリゴヌクレオチドを使用して達成することができる。いくつかの実施形態において、リアルタイムでの検出は、リアルタイムPCRを含む。例示的なプローブオリゴヌクレオチドには、加水分解プローブ、トーチ、および分子ビーコンが含まれる。プローブオリゴヌクレオチドは、フルオロフォアおよびクエンチャーを含み得る。トーチは、各末端に相補的領域を含む。いくつかの実施形態において、相補的領域の1つは、非標的相補的配列である。相補的領域（例えば、非標的相補的配列およびプローブ内のその相補的領域）は、長さが4、5、6、7、または8個のヌクレオベースであり得る。これらの相補的領域は、互いに結合し、「閉鎖」トーチを形成する。閉鎖構成では、フルオロフォアおよびクエンチャーは近接しており、フルオロフォアシグナルはクエンチされる。すなわち、光によって励起されたときに検出可能なシグナルを放出しない。しかしながら、

トーチが相補的標的配列に結合すると、トーチ内の相補的領域は、強制的に離されて、「開放」トーチを形成する。開放形態では、フルオロフォアおよびクエンチャーは近接しておらず、フルオロフォアシグナルは励起時に検出可能である（すなわち、もはやクエンチされていない）。アンプリコントーチ結合は、フルオロフォアからのクエンチャーの分離をもたらす、これにより、光刺激および特定の波長でのシグナル放出に応答したフルオロフォアの励起が可能になる。トーチは、増幅中に存在し、相補的アンプリコンがリアルタイムで生成されるにつれて、それに結合する可能性がある。より多くのアンプリコンが作製されるにつれて、より多くのトーチが結合し、より多くのシグナルが作り出される。シグナルは最終的に、それがバックグラウンドを超える検出され得るレベルに達し、最終的に全ての利用可能なトーチがアンプリコンに結合し、シグナルが最大に達する点に到達する。増幅（amplification）の開始時、および増幅配列のコピー数が少ない場合、プローブオリゴヌクレオチドのほとんどは閉鎖している（3'および5'相補的領域が塩基対合し、蛍光シグナルがクエンチされる）。増幅中、より多くのプローブオリゴヌクレオチドが、標的配列に結合するため、プローブオリゴヌクレオチドの3'および5'末端（相補的領域）が分離し、蛍光の増加（蛍光の消光の低下）につながる。さらなる増幅後、蛍光シグナルは、最大に近づく。

【0045】

「加水分解プローブ」は、リアルタイムPCRに利用できる配列特異的な化学の1つである。加水分解プローブの方法論は、5'ヌクレアーゼアッセイに基づいている。加水分解プローブは、*taqMan*（商標）（加水分解）プローブと呼ばれることがよくある。加水分解プローブは二重標識オリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドの5'末端は蛍光レポーター分子で標識され、3'末端はクエンチャー分子で標識されている。加水分解プローブの配列は、増幅された標的配列の関心領域に特異的である。加水分解プローブは、配列の長さが5'フルオロフォアと3'クエンチャーを十分に近接させて蛍光を抑制するように設計されている。加水分解プローブは、増幅プライマーの結合部位間の目的領域に結合する。PCRサイクルの伸長段階で、*Taq* DNAポリメラーゼはPCR増幅プライマーの下流にある相補鎖を合成する。伸長が結合した加水分解プローブに到達すると、*Taq* DNAポリメラーゼの5'-3'エキソヌクレアーゼ活性が加水分解プローブを分解する。加水分解プローブの切断により、蛍光レポーター分子がプローブの残りの部分から分離され、レポーター分子が蛍光を発するようになる。その後のPCRサイクルでは、放出される蛍光レポーターの量、つまり蛍光が累積的に増加する。いくつかの実施形態において、加水分解プローブは、ステムループ、自己ハイブリダイゼーションまたは他の二次構造を伴わない長さの20〜30個のヌクレオベースである。加水分解プローブは、増幅プライマーに対する配列相補性を含まないか、それらの結合部位と重複しない。いくつかの実施形態において、加水分解プローブのアニーリング温度は、第1および第2の増幅プライマーのアニーリング温度よりも約5〜7℃高い。いくつかの実施形態において、加水分解プローブのアニーリング温度は、第1および第2の増幅プライマーのアニーリング温度よりも約5℃、約6℃、または約7℃高い。

【0046】

「相補的」または「十分に相補的」という用語は、ハイブリダイゼーション（例えば、安定した二本鎖ハイブリッドの形成）を可能にする、2つの一本鎖ポリヌクレオチド（例えば、増幅オリゴヌクレオチドおよび標的核酸配列）または同じ一本鎖ポリヌクレオチドの2つの異なる領域（例えば、分子ビーコン）の間の特定のヌクレオチド塩基対合関係を示す。相補配列は、安定した二重鎖を形成するために完全に相補的（100%相補的）である必要はない。いくつかの実施形態において、部分的に相補的な（標準的な核酸塩基対合に対するミスマッチのために100%未満の相補的）配列は、ポリヌクレオチド配列がアニーリングすることを可能にするならば、十分に相補的なままである。パーセント相補性は、第2の核酸配列との水素結合（例えば、ワトソン・クリック塩基対）を形成することができる第1の核酸配列内の連続鎖中の塩基の割合を示す（例えば、10個のうちの5、6、7、8、9、10個は、50%、60%、70%、80%、90%、および100

%相補的である)。パーセント相補性は、パーセント同一性と同様の方法で計算される。正準(canonical)塩基対では、プリン塩基はピリミジン塩基に水素結合し、アデニンはチミンまたはウラシル(AとTまたはU)と対合し、グアニンはシトシン(CとG)と対合する。塩基対は、これらの正準対のメンバーではない塩基間でも形成される。非正準塩基対合は、分子生物学の当業者によく知られている(例えば、R. L. P. Adams et al., The Biochemistry of the Nucleic Acids (11th ed. 1992)を参照されたい)。適切なハイブリダイゼーション条件は、当業者に周知であり、配列組成に基づいて予測することができるか、または日常的な試験を使用することによって経験的に決定することができる(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. の節1.90~1.91、7.37~7.57、9.47~9.51および11.47~11.57、特に節9.50~9.51、11.12~11.13、11.45~11.47および11.55~11.57)。

【0047】

配列同一性は、Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)のBESTFIT、FASTAおよびTFASTAなどのアルゴリズムを使用し、デフォルトのギャップパラメータを使用して配列を整列させることによって、ならびに検査および最良の整列(すなわち、比較ウィンドウ全体にわたる最高の配列類似性の割合をもたらす)によって決定することができる。配列同一性の割合は、比較ウィンドウ全体にわたって2つの最適に整列された配列を比較し、両方の配列で同一の残基が生じる位置の数を決定して、マッチした位置の数を得て、比較ウィンドウ内のギャップ(すなわち、ウィンドウサイズ)を計数せずにマッチした位置の数をマッチした位置およびミスマッチの位置の総数で割り、結果に100を掛けて、配列同一性の割合を得ることによって計算される。別段の指示がない限り、2つの配列間の比較ウィンドウは、2つの配列のうちのより短い方の全長によって定義される。

【0048】

「自己相補性」とは、互いにハイブリダイズすることができる内部相補配列を含み、オリゴヌクレオチド内に二本鎖構造または領域を作り出すオリゴヌクレオチドを指す。オリゴヌクレオチド内の相補的配列の位置に応じて、配列のハイブリダイゼーションは、ヘアピンループ、接合部、バルジまたは内部ループの形成につながる可能性がある。いくつかの実施形態において、自己相補的配列は、それぞれ、長さが4~6個のヌクレオベースであり得る。いくつかの実施形態において、自己相補的配列は、オリゴヌクレオチドの5'および3'末端に位置する。いくつかの実施形態において、自己相補的配列は、検出プローブなどのオリゴヌクレオチドの5'または3'末端に付加され得る。

【0049】

「ハイブリダイゼーション」または「ハイブリダイズする」とは、2つの完全または部分的に相補的な核酸配列が、平行方向または逆平行方向で、特定のハイブリダイゼーションアッセイ条件下で一体になり、二本鎖領域を有する安定な構造を形成する能力を意味する。ハイブリッドと呼ばれることもあるこの二本鎖構造の2つの構成鎖は、水素結合によって結び付いている。これらの水素結合は、最も一般的には単一核酸鎖上の塩基アデニンとチミンもしくはウラシル(AとTもしくはU)またはシトシンとグアニン(CとG)を含有するヌクレオチド間で形成されるが、塩基対合は、これらの「正準」対のメンバーではない塩基間でも形成され得る。非正準塩基対合は、分子生物学の当業者によく知られている(例えば、R. L. P. Adams et al., The Biochemistry of the Nucleic Acids (11th ed. 1992)を参照されたい)。

【0050】

「優先的にハイブリダイズする」とは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、増幅プライマーまたはプローブオリゴヌクレオチドがその標的核酸にハイブリダ

10

20

30

40

50

イズして安定なオリゴマーすなわち標的ハイブリッドを形成することができるが、十分な数の安定なオリゴマー、すなわち非標的ハイブリッドを形成しないことを意味する。標的核酸に優先的にハイブリダイズする増幅プライマーおよび検出オリゴマーは、標的核酸の増幅および／または検出に有用であるが、特に系統学的に密接に関連する生物における非標的核酸には有用ではない。したがって、オリゴマーは、非標的核酸よりも十分にかなりの程度まで標的核酸にハイブリダイズして、当業者が、必要に応じて、指定された標的に由来する核酸を正確に増幅し、および／またはその存在（もしくは不在）を検出することを可能にする。一般に、オリゴヌクレオチド配列とその標的配列との間の相補性の程度を低下させることは、その標的領域へのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの程度または比率を低下させるであろう。しかしながら、1つ以上の非相補的ヌクレオチドまたはヌクレオベースを含めることは、オリゴヌクレオチドが非標的生物を識別する能力を促進し得る。

【0051】

優先的ハイブリダイゼーションは、当該技術分野で既知であり、かつ本明細書、例えば、以下に提供される実施例などに記載される技術を使用して測定することができる。いくつかの実施形態において、試験サンプル中の標的ハイブリダイゼーションシグナルと非標的ハイブリダイゼーションシグナルとの間に少なくとも10倍の差、少なくとも20倍の差、少なくとも50倍の差、少なくとも100倍の差、少なくとも200倍の差、少なくとも500倍の差、または少なくとも1,000倍の差が存在する。いくつかの実施形態において、試験サンプル中の非標的ハイブリダイゼーションシグナルは、バックグラウンドシグナルレベル以下である。

【0052】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」または「ストリンジェントな条件」とは、オリゴヌクレオチドが標的核酸（BKV核酸など）に優先的にハイブリダイズすることを可能にするが、密接に関連する非標的核酸に由来する核酸には優先的にハイブリダイズすることを可能にしない条件を意味する。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の定義は変化しないが、ストリンジェントなハイブリダイゼーションに使用することができる実際の反応環境は、オリゴマーのGC含量および長さ、オリゴマー配列と試験サンプルに存在し得る非標的核酸配列との間の類似性の程度、ならびに標的配列を含む因子に応じて変化し得る。ハイブリダイゼーション条件には、温度およびハイブリダイゼーション試薬または溶液の組成が含まれる。1種以上のBKV株に由来する標的核酸を本開示のオリゴマーで増幅および／または検出するための例示的なハイブリダイゼーションアッセイ条件は、塩濃度が約0.6～0.9Mの範囲内である場合、約60℃の温度に対応する。特異的ハイブリダイゼーションアッセイ条件は、以下の実施例の節に記載される。他の許容され得るストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、当業者によって容易に確認され得る。

【0053】

言及されるオリゴマーと「BKV核酸へのハイブリダイゼーションについて、ストリンジェントな条件下で競合する」とは、オリゴマーが、ストリンジェントな条件下で、そのBKV標的配列への言及されるオリゴマーの結合を実質的に減少させ、競合するオリゴマーは、過剰に供給された場合に、飽和濃度以下において、言及されるオリゴマーの結合を約20%、30%、40%、50%、もしくはそれ以上低減することができるか、または競合するオリゴマーのT_mが、標的に対する言及されるオリゴマーのT_mの約5、4、3、2、もしくは1℃より高いかもしくはその範囲内であることを意味する。好適なオリゴヌクレオチド競合アッセイ条件および手順は、当該技術分野で既知である。

【0054】

「アッセイ条件」とは、標的核酸へのオリゴヌクレオチドの安定したハイブリダイゼーションを可能にする条件を意味する。アッセイ条件は、標的核酸へのオリゴヌクレオチドの優先的ハイブリダイゼーションを必要としない。

【0055】

「標識」または「検出可能な標識」は、検出可能なプローブオリゴヌクレオチドまたは検出可能なシグナルを生じさせるプローブオリゴヌクレオチドに直接的または間接的に結合された部分または化合物を指す。直接的結合は、共有結合または非共有相互作用（例えば、水素結合、疎水性もしくはイオン相互作用、およびキレートもしくは配位錯体形成）を使用し得るが、間接的結合は、架橋部分またはリンカー（例えば、検出可能なシグナルを増幅する抗体または追加のオリゴヌクレオチド（複数可）を介する）を使用し得る。任意の検出可能な部分、例えば、放射性核種、ビオチンまたはアビジンなどのリガンド、酵素、酵素基質、反応性基、検出可能な色を付与する色素または粒子などの発色団（例えば、ラテックスまたは金属ビーズ）、発光化合物（例えば、生物発光性、リン光性、または化学発光性化合物）、および蛍光化合物（すなわち、フルオロフォア）を使用してもよい。フルオロフォアの実施形態には、約495～650 nmの範囲の光を吸収し、約520～670 nmの範囲の光を放出するものが含まれ、これらには、FAM（フルオレセイン）、TET（商標）（テトラクロロフルオレセイン）、CAL FLUOR（商標）（OrangeまたはRed）、およびQUASAR（商標）化合物として知られるものが含まれる。フルオロフォアは、フルオロフォアに近接したときに光を吸収するクエンチャー分子と組み合わせて使用してもよい。そのようなクエンチャーは、当該技術分野で周知であり、例えば、BLACK HOLE QUENCHER（商標）（またはBlack Hole Quencher-2（BHQ2））を含むがこれに限定されない、BHQ（商標））またはTAMRA化合物が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態には、混合物中の結合標識プローブオリゴヌクレオチドが、非結合標識プローブオリゴヌクレオチドと比較して検出可能な変化を示す均一系において検出可能である「均一で検出可能な標識」が含まれ、これは、ハイブリダイズしていない標識プローブオリゴヌクレオチドからハイブリダイズした標識プローブオリゴヌクレオチドを物理的に除去することなく標識を検出することを可能にする（例えば、米国特許第5,283,174号、同第5,656,207号、および同第5,658,737号）。特定の均一で検出可能な標識には、周知の標準的なAEまたはAE誘導体などのアクリジニウムエステル（「AE」）化合物（米国特許第5,656,207号、同第5,658,737号、および同第5,639,604号）を含む、化学発光化合物が含まれる。標識を合成する方法、標識を核酸に結合する方法、および標識からのシグナルを検出する方法は、周知である（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)の第10章、ならびに米国特許第5,658,737号、同第5,656,207号、同第5,547,842号、同第5,283,174号、および同第4,581,333号、ならびに欧州特許出願第0 747 706号）。AE化合物を核酸に結合する特定の方法は、既知である（例えば、米国特許第5,585,481号および米国特許第5,639,604号、第10欄の6行目、第11欄の3行目、および実施例8を参照されたい）。特定のAE標識位置は、プローブオリゴヌクレオチドの中央領域およびA/T塩基対の領域付近、プローブオリゴヌクレオチドの3'もしくは5'末端、またはプローブオリゴヌクレオチドが所望の標的配列と比較して検出するべきではない既知の配列とのミスマッチ部位もしくはその付近である。他の検出可能な標識されたプローブオリゴヌクレオチドには、TaqMan（商標）（加水分解）プローブ、分子トーチ、および分子ビーコンが含まれる。TaqMan（商標）プローブはドナーおよびアクセプター標識を含み、クエンチャーの存在からフルオロフォアを解放するために増幅中にプローブオリゴヌクレオチドを酵素的に分解すると蛍光が検出される。分子トーチおよびビーコンは、開放および閉鎖配置で存在し、閉鎖配置は、フルオロフォアをクエンチし、開放位置は、フルオロフォアをクエンチャーから分離して蛍光を可能にする。標的へのハイブリダイゼーションは、さもなければ閉鎖したプローブオリゴヌクレオチドを開放する。

【0056】

配列が完全に相補的である必要はないが、配列は、2つの核酸配列の安定したハイブリ

10

20

30

40

50

ダイゼーション、例えば、プローブオリゴヌクレオチドおよび標的配列の安定したハイブリッドを可能にする場合に「十分に相補的」である。十分に相補的な配列は正準塩基対（例えば、G : C、A : T、またはA : U）を使用することにより、相補的なヌクレオチドのサブセットシリーズ間の水素結合によって別の配列にハイブリダイズする。2つの配列は、適切なハイブリダイゼーション条件において、配列全体が安定なハイブリダイゼーション複合体を形成する限り、相補的ではない1つ以上の残基（脱塩基位置を含む）を含み得る。十分に相補的な配列は、互いにハイブリダイズする配列に対して少なくとも約80%、少なくとも約90%、または完全に相補的であり得る。適切なハイブリダイゼーション条件は、当業者に周知であり、配列組成に基づいて予測することができるか、または所定の試験を使用することによって経験的に決定することができる（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. §§1.90~1.91, 7.37~7.57, 9.47~9.51および11.47~11.57, 特に§§9.50~9.51, 11.12~11.13, 11.45~11.47および11.55~11.57）。

【0057】

特に特許請求の範囲における「配列番号Xの配列」への言及は、別段の指示がない限り、対応する配列表の塩基配列を指し、主鎖（例えば、RNA、2'-O-Me RNAまたはDNA）の同一性または塩基修飾（例えば、シトシン残基のメチル化）を必要としない。

【0058】

特に特許請求の範囲における「配列番号Xに存在するヌクレオチド配列」への言及は、別段の指示がない限り、対応する配列表に記載の塩基配列を指し、主鎖（例えば、RNA、2'-O-Me RNAまたはDNA）の同一性または塩基修飾（例えば、シトシン残基のメチル化）を必要としない。対応する配列に存在する塩基配列は、対応する配列表エントリの全塩基配列の全部または一部を含み得る。対応する配列表エントリの全塩基配列の一部は、対応する配列表エントリ内のどこにあってもよい。対応する配列表エントリの全塩基配列の部分は、2~50個の連続するヌクレオベースを含むがこれらに限定されない任意の長さであり得る。

【0059】

オリゴマー中の「縮重」位置とは、1つを超える塩基がオリゴマーの集団中に存在する位置を指す。縮重配列領域の各位置には、2つ以上の可能なヌクレオベースの代替物がある。縮重位置のヌクレオチド代替物は、等しい量で、または等しい確率で存在することができる。例えば、ヌクレオチドはCまたはTを表すYとして提示され得る。縮重位置は、R（AまたはG）、W（AまたはT）、M（AまたはC）、Y（CまたはT）、K（GまたはT）、B（AまたはGまたはT）、D（AまたはGまたはT）、H（AまたはCまたはT）、N（AまたはGまたはCまたはT）、S（GまたはC）、またはV（AまたはCまたはG）であり得るが、これらに限定されない。縮重位置を有するオリゴマーは、縮重位置の導入が所望される合成工程において、所望の縮重の組み合わせに対応するヌクレオチド前駆体の混合物を提供することによって合成され得る。オリゴヌクレオチドは縮重物として合成される場合がある。あるいは、オリゴヌクレオチドを個別の種として合成し、その後混合することができる。

【0060】

オリゴマー中の「非ワトソンクリック」（NWC）位置は、オリゴマーが、G-U、G-T、またはG-A（GまたはU / T / Aのいずれかは、オリゴマー中の塩基であり得る）などの非ワトソンクリック対合により、少なくとも1つのBKV標的配列にハイブリダイズするように構成される位置を指す。いくつかの実施形態において、NWC位置は、ゆらぎ（G-UまたはG-T）またはプリン-プリン（G-A）対を介してハイブリダイズするように構成される。

【0061】

「耐熱性」または「耐熱性ポリメラーゼ」という用語は、熱安定性または耐熱性であり、デオキシリボヌクレオチドの重合を触媒して、核酸鎖に相補的なプライマー伸長産物を

10

20

30

40

50

形成する酵素を指す。本明細書で有用な熱安定性DNAポリメラーゼは、PCR増幅中に一本鎖核酸の不安定化または二本鎖核酸の変性をもたらすのに必要な時間、高温にさらされたときに不可逆的に不活性化されない。酵素の不可逆的な変性は、酵素活性の実質的な喪失を意味する。好ましくは、熱安定性DNAポリメラーゼは、PCR増幅に通常必要とされるような条件下で、約90～100℃で不可逆的に変性しない。

【0062】

「PCRで増幅すること」または「PCR増幅」という用語は、一般に、相補鎖にハイブリダイズする増幅プライマーを用いる、核酸のサイクリングポリメラーゼ媒介指数関数的増幅を指す。特定の波長の光ビームを放出し、蛍光色素の強度を読み取り、各サイクル後に蛍光の強度を表示することができる蛍光指示薬を含む組成物を用いて熱サイクリング反応を実施できるデバイスが開発された。

10

【0063】

別段に定義されない限り、本明細書で使用される全ての科学のおよび技術的用語は、当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。一般的な定義は、分子生物学の分野に関連する技術書、例えば、「*Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd ed.*」(Singleton et al., 1994, John Wiley & Sons, New York, NY) または「*The Harper Collins Dictionary of Biology*」(Hale & Marham, 1991, Harper Perennial, New York, NY) に見ることができる。

20

【0064】

オリゴマー

BKV標的配列の増幅に適した増幅プライマーを表1Aに見ることができる。BKVアンプリコンの検出に好適なプローブオリゴヌクレオチド表1Bに見ることができる。増幅される領域を含むBKV標的領域を、表1Cに示す。

30

40

50

【表 1】

表 1 A. 増幅プライマーオリゴヌクレオチド配列。

配列	配列番号
第 1 の増幅プライマー	
ctagaacttctactcctcctttttatta	1
gcagcaaaacccagcaatagc	4
gactctgtaaaagactccttaggtaag	7
ttagtttcyttggctcaagtaggg	10
ccctacttgagcccaargaaactaa	13
ccttttctttttkgttggggc	16
gggttaaacaatttccaaawgccat	21
ggcctaacwccctcaaacatatgc	24
gaaagagcctgcccggggaaa	25
ttagtttcctttggctcaagtaggg	30
ttagtttcctttggctcaagtaggg	31
ccctacttgagcccaaggaaactaa	34
ccctacttgagcccaaggaaactaa	35
ccttttctttttgggttggggc	38
ccttttctttttgtttggggc	39
gggttaaacaatttccaaawgccat	42
gggttaaacaatttccaaatgccat	43
ggcctaacacccctcaaacatatgc	46
ggcctaactcctcaaacatatgc	47
第 2 の増幅プライマー	
ggccccaacmaaaaagaaaagg	2
ccttgctactgtagagggcataac	5
gcagcagcctcagatacaactggc	9
gggttaaacaatttccaaawgccatgcc	12
ggcctaacwccctcaaacatatgc	14
aaaactattgccccaggagggtgct	18
ttagtttcyttggctcaagtagggta	19
ccctacttgagcccaargaaactaa	22
ctacctttacatcttgcctccattt	26
ggccccaacaaaaaagaaaagg	28
ggccccaacccaaaaaagaaaagg	29
gggttaaacaatttccaaawgccatgcc	32
gggttaaacaatttccaaatgccatgcc	33
ggcctaacacccctcaaacatatgc	36
ggcctaactcctcaaacatatgc	37
ttagtttcctttggctcaagtagggta	40
ttagtttcctttggctcaagtagggta	41
ccctacttgagcccaaggaaactaa	44
ccctacttgagcccaaraaactaa	45
ctacctttacatcttgcctccattt	48
ctacctttacatcctgctccattt	49

10

20

30

40

50

【表 2】

表 1 B. プローブオリゴヌクレオチド配列

配列	配列番号
g g c t t t t t g g g a g c t g c c c c t g g a	3
a g c a c c a g c a a t t a c a g c a t a t g t t t g a g g	6
a t g g g t g c t g c t c t a g c a c t t t t g g g	8
a t t g g g a t c a c a a a g t t t c c a c t g t a g g c	1 1
t t a a a g c a g c a a a c c c a g c a a t a g c c	1 5
a c a g t c c c g t a c a g g c c t a g a a g	1 7
g c c t a c a g t g g a a a c t t t g t g a t c c c a a t	2 0
g g c t a t t g c t g g g t t t g c t g c t t t a a	2 3
c c c t g a c a a a g g g g g c g a c g a g g a t a a a a	2 7

10

20

30

40

50

表 1 C. B K V 遺伝子標的領域配列

40

【表 3 - 2】

c t t c t c t t g t t a t a t c a a g a a t a c a t t t c c c c a t g c a t a t a t t a t a t t t	10
c a t c c t t g a a a a a g t a t a c a t a c t t a t c t c a g a a t c c a g c c t t t c c t t c	
c a t t c a a c a a t t c t a g a c t g t a t a t c t t g t g c a a a a t c a g c t a c a g g c c	
t g a a c c a a a t t a g c a g t a g c a g c a a g g t c a t t c c a c t t t g t a a t a t t c t	
t t t t t c a a g t a a a a a t t c t g a g t t t t g c a g g g a t t t t c t t a a a t a a a t t	
t t a g g t c t a a a a t c t a t c t g t c t t a c a a a t c t a g c c t g c a a g g t t t t g g	
g g a c a g g a t a c t c a t t c a t t g t a a c t a a a c c t g g t g g a a a t a t t t g g g t	
t c t t t t g t t t a a g t g t t t c t t t t c t a a a t t a a c t t t g a c a c t t c c a t c t	
a a a t a a t c c c t t a a a c t g t c t a a a t t g t t t a t t c c a t g t c c t g a a g g c a	
a a t c c t t t g a t t c a g c t c c t g t t c c c t t c a c a t c t t c a a a a c a a c c a t	
a t a c t g a t c t a t a g c c a c a c c c a g t t c a a a a g t a a g c c t t t c c a t g g g t	
a a a t t c a c a t t t t a a a g c t t t g c c t c c a c a t a a a t c t a a t a a c c c t g c a g	
c t a g t g t t g t t t t t t c c a c t a t c a a t t g g a c c t t t g a a t a a c c a g t a t c t	
t c t t t t a g g t a c a t t a a a a a c a a t a c a g t g c a g g a a a t c a a a t a t a a c a	
g a a t c c a t t t t a g g t a g c a a a c a g t g c a g c c a g g c a a c t c c t g c c a t a t	
a t t g t t c t a g t a c a g c a t t t c c a t g a g c t c c a a a t a t t a a a t c c a t t t t	
a t c t a a t a t a t g a t t a a a t c t g t c t g t t a g c a t t t c t t c t c t g g t c t a t a	
t g g a g g g t a t c t a c c c t t t t t t a g c t a a c a c t g t a t c c a c t g c t t g c t	
g a c a a a t a c t t t t t t g a t t t t t a c t t t c t g c a a a a a t g g t a g c a t t t g c	
a a a a t g c t t t t c a t g a t a t t t a a a g t g g t a g g g t t g g t c t t t t t t t t g a	
c a c t t t t t a c a c t c c t c t a c a t t g t a c t g a a a t t c t a a a t a c a t a c c c a	
a t a g t a g a a a c a c a c t c t t c a c a c t t t g t t t c t a c t g c a t a t t c a g t t a t	
t a a t t t c c a g g a c a c c t g e t t t g t t t c t t c a g g t t c c t c t g g g t t a a a a	
t c a t g c t c c t t t a g g c c c c c t t g a a t a c t t t c c t c t a t t a t a t a a t a t g	
g a t c t c t a g t t a a g g c a c t g t a t a g t a a g i a t t c c t t a t t a a c a c c c t t	
a c a a a t t a a a a a c t a a a a g t a c a c a g c t t t t g a c a g a a a t t a t t a a t t	
g c a g a a a c t c t a t g t c t a t g t g g a g t t a a a a g a a t a t a a t a t t a t g a c	
c a g c a c a c a t g t g t c t a c t a a t a a a a g t t a c a g a a t a t t t t t c c a t a a g	
t t t t t t a t a c a g a a t t a a a g c t t t t t c t t t a g t a g t a t a c a c a g c a a a g	
c a g g c a a g a g t t c t a t t a c t a a a t a c a g c t t g a c t a a g a a a c t g g t g t a	
g a t c a g a a g g a a a g t c t t t a g g g t c t t c t a c c t t t c t t t t t t t t t t g g g	
t g g t g t t g a g t g t t g g g a a t c t g c t g t t g c c t c c t c a t c a c t g g c a a a c	
a t a t c t t c a t g g c a g a a t a a a t c t t c a t c c c a t t t t t c a t t a a a g g a c c	
t c c a c c a g g a c t c c c a c t c t t t c t g t t c c a t a g g t t g g c a c c t a t a a a a a	
a a a c a t a a t t a c t t a g g g c c t t c c t a t a a t t t a c t a t t a t c t a a a g a t a	
a a t t a g t t a c c t t a a a g c t t t a g a t c t c t g a a g g g a g t c t c t c c a a i t a	
t t t g g a c c c a c c a t t g c a g a g t t t c t t c a g t t a g g t c t a a g c c a a a c c a	
c t g t g t g a a g c a g t c a a t g c a g t a g c a a t c t a t c c a a a c c a a g g g c t c t	
t t t c t t a a a a a t t t t c t a t t t a a a t g t c t t a a t c t t a g c t g a c a c a g c a	
t g c a a g g g c a g t g c a c a g a a g g c t t t t g g a a c a a a t a g g c c a t t c c t t	
g c a g t a c a g g g t a t c t g g g c a a a g a g g a a a a t c a g c a c a a a c c t c t g a g	
c t a c t c c a g g t t c c a a a a t c a g g c t g g t g a g c t a c c t t t a c a t c c t g c t	
c c a t t t t t t t a t a t a a a g t a t t c a t t t c t c t t c a t t t t t a t c c t c g t c g c	
c c c t t t g t c a g g g t g a a a t t c c t t a c a c t t t c t t a a a t a g g c t t t c c t c	
a t t a a g g g a a g g t t t c c c c a g g c a g c t c t t t c a a g g c c t a a a a g g t c c a	
t g a g c t c c a t g g a t t c c t c c c t g t t t a g c a c t t t t a t c c a t t t t t g c a a a	
a a a t t g c a a a a g a a t a g g g a t t t c c c a a a t a g t t t t g c t a g g c c t c a g	
a a a a a g c c t c c a c a c c c t a c t a c t t g a g a g a a a g g t g g a g g c a g a g g	
c g	
配列番号 5 1 (VP 2 遺伝子配列)	
g a c t c t g t a a a a g a c t c c t a g g t a a g t a a t c c c t t t t t t t t t g t a t t t c	
c a g g t t c a t g g g t g c t g c t c t a g c a c t t t t g g g g g a c c t a g t t g c c a g t	
g t a t c t g a g g c t g c t g c t g c c a c a g g a t t t t c a g t g g c t g a a a t t g c t g	
c t g g g g a g g c t g c t g c t g c t a t a g a a g t t c a a a t t g c a t c c c t t g c t a c	
t g t a g a g g g c a t a a c a a g t a c c t c a g a g g c t a t a g c t g c t a t a g g c c t a	
a c t c c t c a a a c a t a t g c t g t a a t t g c t g g t g c t c c a g g g g c t a t t g c t g	
g g t t t g c t g c t t t a a t t c a a a c t g t t a c t g g t a t t a g t t c t t t g g c t c a	
a g t a g g g t a t a g g t t t t t a g t g a t t g g g a t c a c a a a g t t t c a c t g t a	
g g c c t t t a t c a g c a a t c a g g c a t g g c a t t g g a a t t g t t t a a c c c a g a t g	

10

20

30

40

50

【表 3-3】

a g t a c t a t g a t a t t t t g t t t c c t t g g t g t a a a t a c t t t t t g t a a a t a a t a t
 t c a a t a c c t a g a t a t t c c t a g g c a t t t g g g g t c c t t c t t t g t t g c t a c t a t a t
 t c c c a g g c t t t t g t g g c a t g t t a t t t a g g g g a t c g a t a t a c c t t g c t a t a a c t t
 c a c a a g a a t t t g c a a a g a a a c a g a g a g a t t t c t t t a g a g a c t c c t t g g c
 t a g a t t t t t g g a a g a a a c t a c c t g g a c a a t t g t a a a t g c c c c t g t a a a c
 t t t t a t a a a t t a t a t t c a g g a t t a t t a t t c t a a t t t t g t c c c c t a t t a g g c
 c t t c a a t g g t t a g g c a a g t t t g c t g a a a g g g a a g g a a c c c a g g t a a a t t t
 t g g c c a t a c c t a c a g a a t a g a t g a t g c t g a c a g t a t a c a a g a a g t t a c c
 c a a a g a a t t g g a g t t a a g a a a t a a a g a g a a t g t a c a t t c a g g a g a g t t t a
 t a g a a a a a a c t a t t t g c c c c a g g a g g t g c t a a t c a a a g a a c t g c t c c t c a
 a t g g a t g t t t g c c t t t t g c t t c t a g g c c t g t a c g g g a c t g t a a c a c c t g c t
 c t t g a a g c a t a t g a a g a t g g c c c c a a c c a a a a g a a a a g g a g a g t g t c c a
 g g g g c a g c t c c c a a a a a g c c a a a g g a a c c c g t g c a a g t g c c a a a a c t a c
 t a a t a a a a g g a g g a g t a g a a g t t t c t a g a a g t t a

配列番号52 (LTアンプリコン)

c t a c c t t t a c a t c c t g c t c c a t t t t t t t a t a t a a a g t a t t c a t t c t c t t
 c a t t t t a t c c t c g t c g c c c c c t t t t g t c a g g g t g a a a t t c c t t a c a c t t t
 c t t a a a t a g g c t t t c c t c a t t a a g g g a a g g t t t c c c c a g g c a g c t c t t t
 c

【 0 0 6 5 】

記載される増幅オリゴヌクレオチドは、BKV核酸またはBKVに由来する核酸に特異的にハイブリダイズするように構成される。いくつかの実施形態において、特定の記載される増幅プライマーは、BKV VP2遺伝子に由来する核酸であるBKV VP2遺伝子核酸に特異的にハイブリダイズするように構成される。いくつかの実施形態において、増幅オリゴヌクレオチドは、約18～30塩基長、または約18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、もしくは30塩基長の標的ハイブリダイズ領域を有する。

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態において、増幅オリゴヌクレオチドは、表 1 A のいずれかの配列を含む。いくつかの実施形態において、増幅プライマーは、長さが 18 ～ 30 ヌクレオベースであり、表 1 A の配列のいずれかに対して少なくとも 90 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、増幅プライマーは、長さが 18 ～ 30 ヌクレオベースであり、表 1 A の配列のいずれかに対して 0、1、または 2 個のミスマッチを有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、増幅プライマーは、長さが 18 ～ 30 ヌクレオベースであり、表 1 A の配列のいずれかのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、増幅プライマーは、表 1 A のいずれかの配列を含む。いくつかの実施形態において、増幅プライマーは、ストリンジェントな条件下で B K V 標的核酸への結合について表 1 A のいずれかの配列と競合するオリゴマーを含む。B K V 核酸は、配列番号 50 またはその相補体、配列番号 51 またはその相補体、および配列番号 52 またはその相補体であり得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、増幅プライマーは、長さが 18 ～ 60 ヌクレオベースであり、長さが 18 ～ 30 ヌクレオベースの標的ハイブリダイズ領域を含み、標的ハイブリダイズ領域は、表 1 A のいずれかの配列のヌクレオチド配列を有する。

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態において、第1および／または第2の増幅プライマーは、配列番号50またはその相補体へのハイブリダイズについて、配列番号1、2、4、5、7、9、10、12、13、14、16、18、19、21、22、24、25、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、および／または49のいずれかと競合することができるオリゴマーを含む。

【 0 0 6 8 】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、第1のBKV核酸配列にハイブリダイズし、第2の増幅プライマーは、第2のBKV核酸配列にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、第1のBKV核酸配列に対して90%~100%相補的であり、第2の増幅プライマーは、第2のBKV核酸配列に対して90%~100%相補的である。いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、第1のBKV核酸配列に対して>90%かつ<100%相補的であり、第2の増幅プライマーは、第2のBKV核酸配列に対して>90%かつ<100%相補的である。いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、第1のBKV核酸配列に対して0、1、または2個のミスマッチを含み、第2の増幅プライマーは、第2のBKV核酸配列に対して0、1、または2個のミスマッチを含む。

10

【0069】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマー（第1のプライマー）および第2の増幅プライマー（第2のプライマー）は、BKVアンプリコンを増幅するように構成される。いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーおよび第2の増幅プライマーは、BKV VP2アンプリコンを増幅するように構成される。いくつかの実施形態において、BKVアンプリコンは、長さが約90~約150ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーおよび第2の増幅プライマーは、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、または150ヌクレオチド（または塩基対）の長さのBKVアンプリコンを増幅するように構成される。

20

【0070】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号13のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーは、配列番号14のヌクレオチド配列を含む。

【0071】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号1のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーは、配列番号2のヌクレオチド配列を含む。

30

【0072】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号4のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーは、配列番号5のヌクレオチド配列を含む。

【0073】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号7のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーは、配列番号9のヌクレオチド配列を含む。

【0074】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号10のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーは、配列番号12のヌクレオチド配列を含む。

【0075】

40

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号16のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーは、配列番号18のヌクレオチド配列を含む。

【0076】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号21のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーは、配列番号19のヌクレオチド配列を含む。

【0077】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号24のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーは、配列番号22のヌクレオチド配列を含む。

【0078】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号25のヌクレオチド

50

配列を含み、第2の増幅プライマーは、配列番号26のヌクレオチド配列を含む。

【0079】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号13のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーは、配列番号36および／または配列番号37のヌクレオチド配列を含む。

【0080】

いくつかの実施形態において、1つ以上の第1の増幅プライマーは、配列番号35および／または配列番号36のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーは、配列番号14のヌクレオチド配列を含む。

【0081】

いくつかの実施形態において、1つ以上の第1の増幅プライマーは、配列番号35および／または配列番号36のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーは、配列番号36および／または配列番号37のヌクレオチド配列を含む。

【0082】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号1のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーは、配列番号28および／または配列番号29のヌクレオチド配列を含む。

【0083】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号10のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーは、配列番号32および／または配列番号33のヌクレオチド配列を含む。

【0084】

いくつかの実施形態において、1つ以上の第1の増幅プライマーは、配列番号30および／または配列番号31のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーは、配列番号12のヌクレオチド配列を含む。

【0085】

いくつかの実施形態において、1つ以上の第1の増幅プライマーは、配列番号30および／または配列番号31のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーは、配列番号32および／または配列番号33のヌクレオチド配列を含む。

【0086】

いくつかの実施形態において、1つ以上の第1の増幅プライマーは、配列番号38および／または配列番号39のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーは、配列番号18のヌクレオチド配列を含む。

【0087】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号21のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーは、配列番号40および／または配列番号41のヌクレオチド配列を含む。

【0088】

いくつかの実施形態において、1つ以上の第1の増幅プライマーは、配列番号42および／または配列番号43のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーは、配列番号19のヌクレオチド配列を含む。

【0089】

いくつかの実施形態において、1つ以上の第1の増幅プライマーは、配列番号42および／または配列番号43のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーは、配列番号40および／または配列番号41のヌクレオチド配列を含む。

【0090】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号24のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーは、配列番号44および／または配列番号45のヌクレオチド配列を含む。

【0091】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、1つ以上の第1の増幅プライマーは、配列番号46および／または配列番号47のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーは、配列番号22のヌクレオチド配列を含む。

【0092】

いくつかの実施形態において、1つ以上の第1の増幅プライマーは、配列番号46および／または配列番号47のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーは、配列番号44および／または配列番号45のヌクレオチド配列を含む。

【0093】

いくつかの実施形態において、第1の増幅プライマーは、配列番号25のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーは、配列番号48および／または配列番号49のヌクレオチド配列を含む。

10

【0094】

第1および第2の増幅プライマーは、DNA重合を開始することができる。いくつかの実施形態において、第1および第2の増幅プライマーは、熱安定性DNAポリメラーゼと適合性である。いくつかの実施形態において、第1および第2の増幅プライマーは、サーモフィラス・アクアティカス (*Thermophilus aquaticus*) (Taq) からのDNAポリメラーゼと適合性である。いくつかの実施形態において、第1および第2の増幅プライマーは、TaqによるDNA重合を開始することができる。

【0095】

いくつかの実施形態において、検出可能な標識（標識）を含む増幅オリゴヌクレオチドが提供される。このような増幅オリゴヌクレオチドを、プローブオリゴヌクレオチドとして使用することができる。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、記載される増幅プライマーを使用して作製されたBKV増幅産物の存在または不在を検出するために使用される。

20

【0096】

プローブオリゴヌクレオチドを使用して、BKVアンプリコンを検出することができる、すなわち、プローブオリゴヌクレオチドはBKVアンプリコンにハイブリダイズする。BKVアンプリコンは、記載される増幅プライマーのいずれかを使用して生成することができる。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、BKVアンプリコンの21～30個の連続する塩基に90%～100%相補的な21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30個の連続するヌクレオベースを含む。

30

【0097】

記載されるプローブオリゴヌクレオチドは、BKV核酸に特異的にハイブリダイズするように構成される。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、BKV VP2遺伝子核酸に特異的にハイブリダイズするように構成される。

【0098】

いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、表1Bの配列のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、長さが21～30ヌクレオベースであり、表1Bの配列のいずれかに対して少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、長さが21～30ヌクレオベースであり、表1Bの配列のいずれかに対して0、1、または2個のミスマッチを有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、長さが21～30ヌクレオベースであり、表1Bの配列のいずれかのヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、表1Bの配列のいずれかからなる。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、ストリンジントな条件下でBKV核酸への結合について表1Bの配列のいずれかと競合するオリゴマーを含む。BKV核酸は、配列番号50またはその相補体、配列番号51またはその相補体、および配列番号52またはその相補体であり得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、増幅プライマーは、長さが21～60ヌクレオベースであり、長さが21～30ヌクレオベースの標的ハ

40

50

イブリダイズ領域を含み、標的ハイブリダイズ領域は、表 1 B のいずれかの配列のヌクレオチド配列を有する。

【0099】

いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、配列番号 50 またはその相補体へのハイブリダイズについて、配列番号 3、6、8、11、15、17、20、23、および 27 のいずれかと競合することができるオリゴマーを含む。

【0100】

いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、増幅された B K V 核酸配列にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、増幅された B K V 核酸配列に対して 90%~100% 相補的である。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、増幅された B K V 核酸配列に対して > 90% および < 100% 相補的である。いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、増幅された B K V 核酸配列に対して 0、1、または 2 個のミスマッチを含む。

【0101】

いくつかの実施形態において、検出可能な標識は、非ヌクレオチド標識である。好適な標識には、検出可能な光シグナルを放出する化合物、例えば、均一な混合物中で検出することができるフルオロフォアまたは発光（例えば、化学発光）化合物が含まれる。1つを超える標識および 1つを超える型の標識が、特定のプローブオリゴヌクレオチド上に存在してもよいが、または検出は、各プローブオリゴヌクレオチドが検出可能なシグナルを生成する化合物で標識されるプローブオリゴヌクレオチドの混合物の使用に依存してもよい（例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 6,180,340 号および同第 6,350,579 号を参照されたい）。標識は、共有結合、キレート化、およびイオン相互作用を含む様々な手段によってプローブオリゴヌクレオチドに結合され得るが、いくつかの実施形態において、標識は、共有結合している。例えば、いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、例えば、アクリジニウムエステル（A E）化合物などの結合した化学発光標識を有する（例えば、米国特許第 5,185,439 号、同第 5,639,604 号、同第 5,585,481 号、および同第 5,656,744 号を参照されたい）。蛍光標識または化学発光標識などの標識は、非ヌクレオチドリinker によってプローブオリゴヌクレオチドに結合され得る（例えば、米国特許第 5,585,481 号、同第 5,656,744 号、および同第 5,639,604 号を参照されたい）。

【0102】

検出可能な標識の例には、フルオレセイン、テトラメチルローダミン、I A E D A N S、E D A N S、D A B C Y L、クマリン、B O D I P Y F L、ルシファーイエロー、エオシン、エリスロシン、テトラメチルローダミン、テキサスレッド、C Y 5、フルオレセイン／Q S Y 7 色素などが含まれるが、これらに限定されない。

【0103】

いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチド（例えば、蛍光標識を含む）は、第 1 の標識と相互作用する第 2 の標識をさらに含む。例えば、第 2 の標識はクエンチャーであり得る。そのようなプローブオリゴヌクレオチドは、例えば、t a q M a n（商標）（加水分解）アッセイにおいて使用することができ、このアッセイでは、プローブオリゴヌクレオチドを標的またはアンプリコンにハイブリダイズさせ、それに続いて 5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性を備えるポリメラーゼによる核溶解が、蛍光標識を解放し、それにより、蛍光の増加、または第 2 の標識との相互作用とは独立した蛍光をもたらす。

【0104】

本開示に関連して使用され得る相互作用ドナー／アクセプター標識対の例には、F R E T 対と非 F R E T 対とを区別しようとせず、フルオレセイン／テトラメチルローダミン、I A E D A N S／フルオロセイン、E D A N S／D A B C Y L、クマリン／D A B C Y L、フルオレセイン／フルオレセイン、B O D I P Y F L／B O D I P Y F L、フルオレセイン／D A B C Y L、C a l R e d - 610／B H Q - 2、ルシファーイエロー／D

10

20

30

40

50

ABCYL、Quasar 750/BHQ-2、BODIPY/DABCYL、エオシン/DABCYL、エリスロシン/DABCYL、テトラメチルローダミン/DABCYL、テキサスレッド/DABCYL、CY5/BHQ1、CY5/BHQ2、CY3/BHQ1、CY3/BHQ2、およびフルオレセイン/QSY7色素が挙げられる。当業者であれば、ドナー色素およびアクセプター色素が異なる場合、アクセプターの増感蛍光の出現またはドナー蛍光のクエンチングによって、エネルギー移動が検出され得ることを理解するであろう。いくつかの実施形態において、DABCYLおよびQSY7色素などの非蛍光アクセプターは、直接（すなわち、非増感）アクセプター励起から生じるバックグラウンド蛍光の潜在的な問題を軽減または排除する。ドナー-アクセプター対の一方のメンバーとして使用され得る例示的なフルオロフォア部分には、フルオレセイン、ROX、およびCY色素（例えば、CY5）が含まれる。ドナー-アクセプター対の別のメンバーとして使用され得る例示的なクエンチャー部分には、Glen Research（バージニア州スターリング）、Berry & Associates, Inc.（ミシガン州デクスター）およびBiosearch Technologies, Inc.（カリフォルニア州ノバート）から入手可能な、DABCYL、BlackBerryおよびBLACK HOLE QUENCHER部分が挙げられる。

10

【0105】

いくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、伸長不可能である（すなわち、伸長が遮断される）。例えば、プローブオリゴヌクレオチドは、3'-末端3'-デオキシヌクレオチド（例えば、末端2', 3'-ジデオキシヌクレオチド）を有するか、3'-末端-反転ヌクレオチド（例えば、最後のヌクレオチドが、それが3'から3'へのホスホジエステル結合もしくはその類縁体（ホスホロチオエートなど）によって最後から2番目のヌクレオチドに結合するように反転している）を有するか、または結合したフルオロフォア、クエンチャー、もしくは伸長を妨害する他の標識（おそらく末端ヌクレオチドの3'位を介して結合するが、必ずしもそうとは限らない）を有する、3'-リン酸化によって伸長不能にすることができる。いくつかの実施形態において、3'-末端ヌクレオチドは、メチル化されていない。

20

【0106】

記載される増幅オリゴヌクレオチド（例えば、増幅プライマーおよびプローブオリゴヌクレオチド）のいずれも、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含むことができる。修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、または5'-メチルシトシンであり得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、増幅オリゴヌクレオチドは、2つ以上の修飾ヌクレオチドを含む。2つ以上の修飾ヌクレオチドは、同じであっても、異なってもよい。いくつかの実施形態において、記載される増幅オリゴヌクレオチドのいずれかは、1つ以上の5'-メチルシトシンを含み得る。増幅オリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8個、またはそれ以上の2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾オリゴヌクレオチド、5'-メチルシトシン、またはそれらの組み合わせを有し得る。いくつかの実施形態において、増幅オリゴヌクレオチド中のすべてのシトシンヌクレオチドは、5'-メチルシトシン修飾ヌクレオチドである。いくつかのオリゴマーでは、5'-メチル-2'-デオキシシトシン塩基を使用して、（対応する非メチル化オリゴマーに対して）オリゴヌクレオチドに組み込まれた各5'-メチル-2'-デオキシシトシンのTmを約0.5℃~1.3℃上げることによって、二本鎖の安定性を増加させることができる。

30

40

【0107】

組成物およびキット

本開示は、サンプル中のBKVの増幅、検出、および／または定量化に有用な増幅オリゴヌクレオチド、組成物、およびキットを提供する。

【0108】

サンプル中のBKV標的核酸の存在もしくは不在を決定するため、またはその量を定量化するための反応混合物もまた、本開示によって提供される。本開示による反応混合物は

50

、以下のいずれか少なくとも1つ以上：B K V 標的核酸の増幅のための本明細書に記載の増幅プライマー対、およびB K V 増幅産物の存在もしくは不在を決定するための本明細書に記載のプロブオリゴヌクレオチド、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の任意の増幅プライマーの組み合わせを、キットで提供することができる。組成物、キットおよび／または反応混合物は、いくつかの任意の成分をさらに含み得る。増幅反応混合物については、反応混合物は、典型的には、インビトロでの増幅を行うのに適した他の試薬、例えば、緩衝液、塩溶液、適切なヌクレオチド三リン酸（例えば、d A T P、d C T P、d G T P および d T T P；および／またはA T P、C T P、G T P およびU T P）、および／または酵素（例えば、熱安定性D N A ポリメラーゼ、逆転写酵素、および／またはR N A ポリメラーゼ）などを含み、必要に応じて、B K V 標的核酸が存在してもまたは存在しなくてもよい試験サンプル成分を含むであろう。反応混合物は、B K V ゲノムの1つの標的領域のみに対する増幅オリゴヌクレオチドを含み得るか、または複数のB K V 標的領域に対する増幅オリゴヌクレオチドを含み得る。加えて、増幅プライマー対の組み合わせと共にプロブオリゴヌクレオチドを含む反応混合物については、反応混合物に対する増幅プライマー対およびプロブオリゴヌクレオチドの選択は、共通の標的領域によって連結される（すなわち、反応混合物は、反応混合物の増幅プライマー対によって増幅可能な配列に結合するプロブオリゴヌクレオチドを含むであろう）。いくつかの実施形態において、キットは、B K V を増幅および／または検出するための増幅オリゴヌクレオチド、ならびに1種以上の他の非B K V 生物を検出するための増幅オリゴヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態において、キットまたは反応混合物は、増幅プライマー対を含む。この対の第1および第2の増幅プライマーを、単一の容器または別個の容器で提供することができる。いくつかの実施形態において、キットまたは反応混合物は、プロブオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、キットまたは反応混合物は、増幅プライマー対およびプロブオリゴヌクレオチドを含む。増幅プライマーおよびプロブオリゴヌクレオチドを、単一の容器または別個の容器で提供することができる。

【0109】

いくつかの実施形態において、反応混合物は、K C l を含む。いくつかの実施形態において、K C l 濃度は、約50mMである。いくつかの実施形態において、K C l 濃度は、約50mM超、例えば、約60～150mM、約75～125mM、約80～120mM、約85～115mM、または約90～110mMである。いくつかの実施形態において、K C l 濃度は、55～65、65～75、75～85、85～95、95～105、105～115、115～125、125～135、または135～145であり、上記の各々は、mMの単位であり、必要に応じて「約」によって修飾される。いくつかの実施形態において、本開示による組成物は、例えば、上記の濃度のいずれかのK C l を含む。いくつかの実施形態において、本開示による方法は、例えば、上記の濃度のいずれかのK C l の存在下で、増幅反応を実施することを含む。

【0110】

いくつかの実施形態において、増幅オリゴヌクレオチドは、例えば、キットまたは組成物中に提供される。増幅オリゴヌクレオチドは一般に、例えば、B K V 核酸に特異的にハイブリダイズするように構成された標的ハイブリダイズ領域を含む。

【0111】

いくつかの実施形態において、一方の増幅プライマーが、B K V 核酸のセンス鎖にハイブリダイズするように構成され、他方が、B K V 核酸のアンチセンス鎖にハイブリダイズするように構成される、増幅プライマーの対が提供される。そのような増幅プライマーは、P C R、転写媒介増幅、または当該技術分野で既知の他の形態の増幅のためのプライマー対を含む。

【0112】

いくつかの実施形態において、増幅プライマー対、プロブオリゴヌクレオチド、またはそれらの組み合わせなどの1つ以上の増幅オリゴヌクレオチドは、B K V 核酸配列にハ

10

20

30

40

50

ハイブリダイズするように構成される。いくつかの実施形態において、増幅プライマー対、プローブオリゴヌクレオチドまたはそれらの組み合わせなどの1つ以上の増幅オリゴヌクレオチドは、B K V V P 2 遺伝子にハイブリダイズするように構成される。いくつかの実施形態において、増幅プライマー対、プローブオリゴヌクレオチド、またはそれらの組み合わせなどの1つ以上の増幅オリゴヌクレオチドは、配列番号50および／またはその相補体、配列番号51および／またはその相補体、または配列番号52および／またはその相補体によって表されるB K V 配列にハイブリダイズするように構成される。いくつかの実施形態において、1つ以上の内部対照プローブオリゴヌクレオチドも提供される。

【0113】

いくつかの実施形態において、1つ以上の増幅オリゴヌクレオチドは、縮重位置を含む。いくつかの実施形態において、B K V 増幅プライマー、B K V 増幅プライマー対、および／またはB K V プローブオリゴヌクレオチドは、縮重位置を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の増幅オリゴヌクレオチドは、非ワトソクリック（NWC）位置を含む。いくつかの実施形態において、B K V 増幅プライマー、B K V 増幅プライマー対、および／またはB K V プローブオリゴヌクレオチドは、NWC 位置を含む。

【0114】

いくつかの実施形態において、セット、キット、組成物、または反応混合物中の1つ以上の増幅オリゴヌクレオチドは、メチル化シトシン（例えば、5-メチルシトシン）を含む。いくつかの実施形態において、増幅オリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8個、またはそれ以上の2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾オリゴヌクレオチド、5-メチルシトシン、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、増幅オリゴヌクレオチド中のシトシンの少なくとも約半分は、メチル化されている。いくつかの実施形態において、増幅オリゴヌクレオチド中のシトシンの全てまたは実質的に全て（例えば、1つまたは2つを除く全て）は、メチル化されている。いくつかの実施形態において、3'末端または3'末端の2、3、4もしくは5塩基内のシトシンは、メチル化されていない。

【0115】

いくつかの実施形態において、組成物またはキットは、検出可能なマーカを含むプローブオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、組成物またはキットは、蛍光標識およびクエンチャーを含むプローブオリゴヌクレオチドを含む。蛍光標識およびクエンチャーは、6'-カルボキシ-X-ローダミン（ROX）およびアクリジンクエンチャー、ならびにD A B C Y Lクエンチャーを有するフルオレセイン（FAM）であり得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、組成物またはキットは、2つ以上のプローブオリゴヌクレオチドを含む。2つ以上のプローブオリゴヌクレオチドは、異なるアンプリコンの同じアンプリコン（すなわち、増幅された標的配列）を検出し得る。異なるアンプリコンは、同じ生物または異なる生物（ウイルスを含む）に由来する場合がある。いくつかの実施形態において、2つ以上のプローブオリゴヌクレオチドは、互いに区別することができる異なる検出可能な標識を含む。いくつかの実施形態において、異なる検出可能な標識は、異なる波長で光を放出するフルオロフォアである。

【0116】

いくつかの実施形態において、キット、組成物、または反応混合物は、1つ以上のD N A ポリメラーゼ、陽性対照核酸、陰性対照核酸、内部対照核酸、デオキシリボヌクレチド（すなわち、d N T P（例えば、d A T P、d T T P、d G T Pおよびd C T P））、K C l、M g C l₂、酢酸カリウム、緩衝液、B S A、スクロース、トレハロース、D M S O、ベタイン、ホルムアミド、グリセロール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、アンモニウムイオン、E D T A、ならびにP C R 増幅に適した他の試薬または緩衝液をさらに含有する。D N A ポリメラーゼは、熱安定性D N A ポリメラーゼ（例えば、T a q ポリメラーゼ）であり得るが、これに限定されない。緩衝液は、T r i s - H C l およびT r i s - アセテートであり得るが、これらに限定されない。非イオン性界面活性剤は、T w e e n - 20およびT r i t o n X - 100であり得るが、これらに限定さ

10

20

30

40

50

れない。いくつかの実施形態において、キット、組成物、または反応混合物は、1種以上の標的核酸配列を増幅し、必要に応じて検出するために必要な成分を含む。

【0117】

ある特定の実施形態において、キットは、本開示による方法を実施するための一組の説明書をさらに含み、説明書は、添付文書、および／またはキットもしくはその構成要素の包装に関連し得る。

【0118】

本明細書に開示されるあらゆる方法が、本方法の目的に向けられた方法において関与する材料の対応する使用の開示としても理解されるべきである。BKV配列を含む増幅オリゴヌクレオチドのいずれか、およびそのような増幅オリゴヌクレオチドを含む任意の組み合わせ（例えば、キットおよび組成物）は、BKVの検出および／または定量化における使用、またはBKV核酸配列の増幅における使用、ならびにBKVを検出および／または定量化するための組成物の調製における使用、またはBKV核酸配列を増幅することにおける使用のためにも開示されるものとして理解されるべきである。

【0119】

BKVを増幅、検出、およびまたは定量化する方法

BKVを検出および／または定量化する方法、または1つ以上の上記の増幅オリゴヌクレオチド、組成物もしくはキットを使用してBKV核酸配列を増幅する方法が記載されている。いくつかの実施形態において、記載される増幅オリゴヌクレオチドを使用して、サンプル中に存在するBKVを50コピー以下、40コピー以下、30コピー以下、20コピー以下、または10コピー以下で検出することができる。いくつかの実施形態において、記載されるオリゴヌクレオチドを使用する検出率は、BKVがサンプルあたり10、20、30、40、50、またはそれ以上のコピーで存在する場合、95%以上である。

【0120】

いくつかの実施形態において、記載される増幅プライマーおよびプローブオリゴヌクレオチドを使用して、臨床サンプルまたは考案された臨床サンプル中のBKVを増幅および／または検出することができる。いくつかの実施形態において、記載される増幅プライマーおよびプローブオリゴヌクレオチドは、BKVの1つ以上の株を増幅、検出、および／または定量化するために使用され得る。いくつかの実施形態において、記載される増幅プライマーおよびプローブオリゴヌクレオチドは、血漿、血清、または尿中に一般的に見られる生物との交差反応性をほとんどまたは全く示さない。いくつかの実施形態において、記載される増幅プライマーおよびプローブオリゴヌクレオチドは、血漿、血清、または尿中に一般的に見られる生物の存在下でBKVを検出するために使用され得る。いくつかの実施形態において、BKVに対する記載される増幅プライマーおよびプローブオリゴヌクレオチドを使用して、BKV以外の1種以上の生物からの核酸を検出するために使用される、またはBKVの異なる領域に対する他の増幅プライマーおよびプローブオリゴヌクレオチドの存在下でBKVを増幅および／または検出することができる。いくつかの実施形態において、BKV以外の生物は、CMVおよびEBVである。

【0121】

いくつかの実施形態において、BKVについて記載される増幅プライマーおよびプローブオリゴヌクレオチドは、製造日から少なくとも3ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも9ヶ月、少なくとも12ヶ月、少なくとも15ヶ月、少なくとも18ヶ月、または少なくとも24ヶ月の貯蔵寿命を有する。

【0122】

大まかに言えば、この方法は、1つ以上の次の構成要素、すなわち増幅、および増幅を伴うリアルタイムで実施され得るアンプリコンの検出および／または定量化を含むことができる。ある特定の実施形態は、上記の工程の各々を伴う。

【0123】

いくつかの実施形態において、増幅は、サンプルを、BKV標的核酸に対応するBKV核酸標的領域を増幅するための少なくとも2つのオリゴマーと接触させることであって、

オリゴマーが、上記のような少なくとも2つの増幅プライマーを含むこと（例えば、センス方向に配向された1つ以上およびアンチセンス方向に配向された1つ以上）と、（2）インビトロでの核酸増幅反応を実施することによって、サンプル中に存在する場合、B K V 標的核酸が、増幅産物を生成するための鋳型として使用され得ることと、（3）増幅産物の存在または不在を検出し、それによりサンプル中のB K V の存在または不在を判定すること、またはサンプル中のB K V 核酸の量を定量することを含む。

【0124】

本開示による検出方法は、本方法のその後の工程に供されるサンプルを得る工程をさらに含むことができる。ある特定の実施形態において、使用されるサンプルを「得ること」は、例えば、本方法の1つ以上の工程が実施される試験施設もしくは他の場所でサンプルを受け取ること、および／または本方法の1つ以上の工程が実施される施設内の場所から（例えば、保管施設もしくは他の保管所から）サンプルを受け取ることを含む。

【0125】

ある特定の実施形態において、本方法は、例えば、捕捉工程前などの増幅前に、サンプル中の他の成分からB K V 標的核酸を精製することをさらに含む。そのような精製は、サンプル中に含有される生物を他のサンプル成分から分離および／もしくは濃縮するか、または非核酸サンプル成分、例えば、タンパク質、炭水化物、塩、脂質などを除去もしくは分解する方法を含んでもよい。いくつかの実施形態において、サンプル中のDNAは、例えば、DNaseを用いて分解され、必要に応じてDNaseを除去もしくは不活性化するか、または分解されたDNAを除去する。

【0126】

いくつかの実施形態において、方法はサンプル調製を含む。サンプル調製とは、増幅および／または検出のためのサンプルを調製するのに必要な任意の工程または方法を指す。サンプル調製は、より大きいサンプル量からの空中浮遊もしくは水性粒子の濾過によるもの、または標準的な微生物学的方法を使用することによるサンプルからの微生物の単離によるものなど、より大きいサンプル量からポリヌクレオチドなどの成分を精製または濃縮する任意の既知の方法を含み得る。サンプル調製はまた、細胞内成分を実質的に水相または有機相に放出するための細胞成分の物理的破壊および／または化学的溶解、ならびに破片の除去を含み得る。サンプル調製はまた、標的核酸を選択的にまたは非特異的に捕捉し、それを他のサンプル成分から分離するためのポリヌクレオチドの使用を含み得る（例えば、米国特許第6,110,678号および国際特許出願公開WO2008/016988号、参照により本明細書に組み込まれる）。

【0127】

非特異的標的捕捉方法は、実質的に水性の混合物からの核酸の選択的沈殿、他のサンプル成分を除去するために洗浄される支持体への核酸の付着、またはB K V 核酸および他のサンプル成分を含有する混合物から核酸を物理的に分離する他の手段を伴ってもよい。

【0128】

B K V 標的配列を増幅させることは、増幅される標的領域に隣接する少なくとも2つの増幅プライマーを使用するインビトロ増幅反応を利用する。いくつかの実施形態において、上記の少なくとも第1および第2の増幅プライマーを使用して、標的配列を増幅する。増幅反応は、熱サイクリングまたは等温であり得る。好適な増幅方法には、レプリカーゼ媒介増幅、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、鎖置換増幅（SDA）、および転写媒介または転写関連増幅（TMA）が含まれるが、これらに限定されない。

【0129】

検出工程は、例えば、増幅産物を標識されたプローブオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせ、標識されたプローブオリゴヌクレオチドから（いくつかの実施形態において、ハイブリダイゼーション後にプローブオリゴヌクレオチドから放出された標識から、を含む）生じるシグナルを検出することなどによって、増幅された標的配列に特異的に関連するシグナルを検出するための様々な既知の技術のいずれかを使用して実施され得る。いく

つかの実施形態において、標識プローブオリゴヌクレオチドは、上で検討されたように、クエンチャーまたは第1の標識と相互作用する他の部分などの第2の部分を含む。検出工程はまた、例えば、その核酸塩基配列の全部または一部など、増幅された配列に関するさらなる情報を提供し得る。検出は、増幅反応が完了した後に実施され得るか、または標的領域を、例えばリアルタイムで、増幅させることと同時に実施され得る。いくつかの実施形態において、検出工程は、均一な検出、例えば、混合物からハイブリダイズしていないプローブオリゴヌクレオチドを除去することなくハイブリダイズしたプローブオリゴヌクレオチドを検出することを可能にする（例えば、米国特許第5,639,604号および同第5,283,174号を参照されたい）。いくつかの実施形態において、核酸は、検出可能な電気的变化などの物理的变化をもたらす表面と会合する。増幅された核酸は、それらをマトリックス中またはマトリックス上に濃縮し、それらと会合した色素（例えば、臭化エチジウムまたはサイバグリーンなどの挿入剤）を検出することにより、または溶液相中の核酸と会合した色素の増加を検出することにより検出され得る。他の検出方法は、増幅産物中の配列に特異的にハイブリダイズし、プローブオリゴヌクレオチド：生成物複合体の存在を検出するように構成されるプローブオリゴヌクレオチドを使用してもよく、または増幅産物に会合した検出可能なシグナルを増幅させ得るプローブオリゴヌクレオチドの複合体を使用すること（例えば、各々が参照によって本明細書に組み込まれる、米国特許第5,424,413号、同第5,451,503号、および同第5,849,481号）によってもよい。増幅産物と特異的に会合する直接的または間接的に標識されたプローブオリゴヌクレオチドは、サンプル中の標的核酸の存在を示す検出可能なシグナルを提供する。特に、増幅産物は、BKVゲノム中の標的配列またはBKVゲノム中の配列に相補的な配列を含有し、プローブオリゴヌクレオチドは、増幅産物に含有される配列に直接的にまたは間接的に結合して、試験サンプル中のBKV核酸の存在を示す。

【0130】

増幅工程の終了近くまたは終了時に増幅産物を検出するいくつかの実施形態において、線形プローブオリゴヌクレオチドを使用して、増幅産物へのプローブオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを示すシグナルを提供してもよい。そのような検出の一例は、標的核酸にハイブリダイズする発光標識プローブオリゴヌクレオチドを使用する。次いで、発光標識は、非ハイブリダイズプローブオリゴヌクレオチドから加水分解される。検出は、ルミノメーターを使用して化学発光によって実施される（例えば、国際特許出願公開WO89/002476号を参照されたい）。リアルタイム検出を使用するいくつかの実施形態において、プローブオリゴヌクレオチドは、例えば、プローブオリゴヌクレオチドが増幅産物に結合するときに検出されるレポーター部分で標識される分子ビーコン、分子トーチ、またはハイブリダイゼーションスイッチプローブなどのヘアピンプローブであってもよい。そのようなプローブオリゴヌクレオチドは、標的ハイブリダイズ配列および非標的ハイブリダイズ配列を含み得る。

【0131】

実施形態の一覧

1. BKVポリオーマウイルス（BKV）核酸配列を増幅するための増幅オリゴヌクレオチドであって、

a) 1つ以上の第1の増幅プライマーであって、各第1の増幅プライマーは、長さが18～30ヌクレオベースであり、配列番号13、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10、配列番号16、配列番号21、配列番号24、配列番号25、配列番号30、配列番号31、配列番号34、配列番号35、配列番号38、配列番号39、配列番号42、配列番号43、配列番号46、および配列番号47からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、第1の増幅プライマーと、

b) 1つ以上の第2の増幅プライマーであって、各第2の増幅プライマーは、長さが19～30個のヌクレオベースであり、配列番号14、配列番号2、配列番号5、配列番号9、配列番号12、配列番号18、配列番号19、配列番号22、配列番号26、配列番号

号 28、配列番号 29、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 48、および配列番号 49 からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 90% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、第 2 の増幅プライマーと、を含む、BK ポリオーマウイルス (BKV) 核酸配列を増幅するための増幅オリゴヌクレオチド。

【0132】

2. 実施形態 1 の増幅オリゴヌクレオチドであって、

a) 第 1 の増幅プライマーが、配列番号 13、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 10、配列番号 16、配列番号 21、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 46、および配列番号 47 からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して 0、1、または 2 個のミスマッチを有するヌクレオチド配列を含み、

10

b) 第 2 の増幅プライマーが、配列番号 14、配列番号 2、配列番号 5、配列番号 9、配列番号 12、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 22、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 48、および配列番号 49 からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して 0、1、または 2 個のミスマッチを有するヌクレオチド配列を含む、増幅オリゴヌクレオチド。

【0133】

20

3. 第 1 の増幅プライマーが第 1 の BKV 核酸配列に 90% ~ 100% 相補的であり、第 2 の増幅プライマーが第 2 の BKV 核酸配列に 90% ~ 100% 相補的である、実施形態 2 の増幅オリゴヌクレオチド。

【0134】

4. 第 1 の増幅プライマーが第 1 の BKV 核酸配列に > 90% かつ < 100% 相補的であり、第 2 の増幅プライマーが第 2 の BKV 核酸配列に > 90% かつ < 100% 相補的である、実施形態 3 の増幅オリゴヌクレオチド。

【0135】

5. 第 1 の増幅プライマーおよび／または第 2 の増幅プライマーが少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つの増幅オリゴヌクレオチド。

30

【0136】

6. 修飾ヌクレオチドが、2' Oメチル修飾ヌクレオチド、2' フルオロ修飾ヌクレオチド、または 5' メチル-2' -デオキシシトシンを含む、実施形態 1 ~ 5 のいずれか 1 つの増幅オリゴヌクレオチド。

【0137】

7. 第 2 の増幅プライマーが 1 つ以上の 5-メチル-2' -デオキシシトシンを含む、実施形態 6 の増幅オリゴヌクレオチド。

【0138】

8. 3' 末端シトシンが存在する場合を除いて、第 2 の増幅プライマー中のすべてのシトシンが 5-メチル-2' -デオキシシトシンである、実施形態 7 の増幅オリゴヌクレオチド。

40

【0139】

9. 第 1 の増幅プライマーが 1 つ以上の 5-メチル-2' -デオキシシトシンを含む、実施形態 6 の増幅オリゴヌクレオチド。

【0140】

10. 3' 末端シトシンが存在する場合を除いて、第 1 の増幅プライマー中のすべてのシトシンが 5-メチル-2' -デオキシシトシンである、実施形態 9 の増幅オリゴヌクレオチド。

【0141】

11. 実施形態 1 ~ 10 のいずれか 1 つの増幅オリゴヌクレオチドであって、

50

a) 1つ以上の第1の増幅プライマーのヌクレオチド配列が、配列番号13、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10、配列番号16、配列番号21、配列番号24、配列番号25、配列番号30、配列番号31、配列番号34、配列番号35、配列番号38、配列番号39、配列番号42、配列番号43、配列番号46、および配列番号47からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなり、

b) 1つ以上の第2の増幅プライマーのヌクレオチド配列が、配列番号14、配列番号2、配列番号5、配列番号9、配列番号12、配列番号18、配列番号19、配列番号22、配列番号26、配列番号28、配列番号29、配列番号32、配列番号33、配列番号36、配列番号37、配列番号40、配列番号41、配列番号44、配列番号45、配列番号48、および配列番号49からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなる、増幅オリゴヌクレオチド。

10

【0142】

12. 実施形態1～11のいずれか1つの増幅オリゴヌクレオチドであって、

a) 第1の増幅プライマーが、配列番号13のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号14のヌクレオチド配列を含む、

b) 第1の増幅プライマーが、配列番号1のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号2のヌクレオチド配列を含む、

c) 第1の増幅プライマーが、配列番号4のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号5のヌクレオチド配列を含む、

d) 第1の増幅プライマーが、配列番号7のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号9のヌクレオチド配列を含む、

20

e) 第1の増幅プライマーが、配列番号10のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号12のヌクレオチド配列を含む、

f) 第1の増幅プライマーが、配列番号16のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号18のヌクレオチド配列を含む、

g) 第1の増幅プライマーが、配列番号21のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号19のヌクレオチド配列を含む、

h) 第1の増幅プライマーが、配列番号24のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号22のヌクレオチド配列を含む、または

i) 第1の増幅プライマーが、配列番号25のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号26のヌクレオチド配列を含む、増幅オリゴヌクレオチド。

30

【0143】

13. 実施形態1～12のいずれか1つの増幅オリゴヌクレオチドであって、

a) 第1の増幅プライマーが、配列番号13のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号36および配列番号37のヌクレオチド配列を含む、

b) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号35および配列番号36のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号14のヌクレオチド配列を含む、

c) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号35および配列番号36のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号36および配列番号37のヌクレオチド配列を含む、

40

d) 第1の増幅プライマーが、配列番号1のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号28および配列番号29のヌクレオチド配列を含む、

e) 第1の増幅プライマーが、配列番号10のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号32および配列番号33のヌクレオチド配列を含む、

f) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号30および配列番号31のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号12のヌクレオチド配列を含み、

g) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号30および配列番号31のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号32および配列番号33のヌクレオチド配列を含む、

h) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号38および配列番号39のヌクレオ

50

チド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号18のヌクレオチド配列を含み、

i) 第1の増幅プライマーが、配列番号21のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号40および配列番号41のヌクレオチド配列を含む、

j) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号42および配列番号43のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号19のヌクレオチド配列を含む、

k) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号42および配列番号43のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号40および配列番号41のヌクレオチド配列を含む、

l) 第1の増幅プライマーが、配列番号24のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号44および配列番号45のヌクレオチド配列を含む、

m) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号46および配列番号47のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号22のヌクレオチド配列を含む、

n) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号46および配列番号47のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号44および配列番号45のヌクレオチド配列を含む、または

o) 第1の増幅プライマーが、配列番号25のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号48および配列番号49のヌクレオチド配列を含む、増幅オリゴヌクレオチド。

【0144】

14. 長さが21~30ヌクレオベースのプローブオリゴヌクレオチドを含み、配列番号15、配列番号3、配列番号6、配列番号8、配列番号11、配列番号17、配列番号20、配列番号23、および配列番号27からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、増幅されたBKV核酸配列を検出するためのプローブオリゴヌクレオチド。

【0145】

15. プローブオリゴヌクレオチドが、配列番号15、配列番号3、配列番号6、配列番号8、配列番号11、配列番号17、配列番号20、配列番号23、および配列番号27からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して0、1、または2個のミスマッチを有するヌクレオチド配列を含む、実施形態14のプローブオリゴヌクレオチド。

【0146】

16. プローブオリゴヌクレオチドが、第3のBKV核酸配列に90%~100%相補的である、実施形態15のプローブオリゴヌクレオチド。

【0147】

17. プローブオリゴヌクレオチドが、第3のBKV核酸配列に対して>90%かつ<100%相補的である、実施形態16のプローブオリゴヌクレオチド。

【0148】

18. プローブオリゴヌクレオチドが少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む、実施形態14~17のいずれか1つに記載のプローブオリゴヌクレオチド。

【0149】

19. 修飾ヌクレオチドが、2'-Oメチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、または5'-メチル-2'-デオキシシトシンを含む、実施形態18のプローブオリゴヌクレオチド。

【0150】

20. プローブオリゴヌクレオチドが1つ以上の5'-メチル-2'-デオキシシトシンを含む、実施形態19のプローブオリゴヌクレオチド。

【0151】

21. プローブオリゴヌクレオチドが2、3、4、5、6、7または8個の5'-メチル-2'-デオキシシトシンを含む、実施形態20のプローブオリゴヌクレオチド。

【0152】

22. プローブオリゴヌクレオチド中のすべてのシトシンが5'-メチル-2'-デオキシ

10

20

30

40

50

シトシンである、実施形態 20 のプローブオリゴヌクレオチド。

【0153】

23. プローブオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列が、配列番号 15、配列番号 3、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 11、配列番号 17、配列番号 20、配列番号 23、および配列番号 27 からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなる、実施形態 14～22 のいずれか 1 つのプローブオリゴヌクレオチド。

【0154】

24. プローブオリゴヌクレオチドが検出可能な標識を含む、実施形態 14～23 のいずれか 1 つのプローブオリゴヌクレオチド。

【0155】

25. 検出可能な標識が蛍光分子を含む、実施形態 24 のプローブオリゴヌクレオチド。

【0156】

26. 蛍光分子が、プローブオリゴヌクレオチドの 5' または 3' 末端に結合している、実施形態 25 に記載のプローブオリゴヌクレオチド。

【0157】

27. プローブオリゴヌクレオチドがクエンチャーを含む、実施形態 24～26 のいずれか 1 つのプローブオリゴヌクレオチド。

【0158】

28. 検出可能な標識がプローブオリゴヌクレオチドの 5' 末端に結合し、クエンチャーがプローブオリゴヌクレオチドの 3' 末端に結合している、実施形態 27 のプローブオリゴヌクレオチド。

【0159】

29. プローブオリゴヌクレオチドが加水分解プローブである、実施形態 24～28 のいずれか 1 つに記載のプローブオリゴヌクレオチド。

【0160】

30. B K V 核酸配列を増幅するための反応混合物であって、

a) 1 つ以上の第 1 の増幅プライマーであって、各第 1 の増幅プライマーは、長さが 20～30 ヌクレオベースであり、配列番号 13、1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 10、配列番号 16、配列番号 21、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 46、および配列番号 47 からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 90% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、第 1 の増幅プライマーと、

b) 1 つ以上の第 2 の増幅プライマーであって、各第 2 の増幅プライマーは、長さが 21～30 個のヌクレオベースであり、配列番号 14、配列番号 2、配列番号 5、配列番号 9、配列番号 12、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 22、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 48、および配列番号 49 からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 90% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、第 2 の増幅プライマーと、を含む、B K V 核酸配列を増幅するための反応混合物。

【0161】

31. 実施形態 30 の反応混合物であって、

a) 第 1 の増幅プライマーが、配列番号 13、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 10、配列番号 16、配列番号 21、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 46、および配列番号 47 からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して 0、1、または 2 個のミスマッチを有するヌクレオチド配列を含み、

b) 第 2 の増幅プライマーが、配列番号 14、配列番号 2、配列番号 5、配列番号 9、

10

20

30

40

50

配列番号 12、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 22、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 48、および配列番号 49 からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して 0、1、または 2 個のミスマッチを有するヌクレオチド配列を含む、増幅オリゴヌクレオチド。

【0162】

32. 第 1 の増幅プライマーが第 1 の B K V 核酸配列に 90%~100% 相補的であり、第 2 の増幅プライマーが第 2 の B K V 核酸配列に 90%~100% 相補的である、実施形態 30 または 31 の反応混合物。

【0163】

33. 第 1 の増幅プライマーが第 1 の B K V 核酸配列に対して >90% かつ <100% 相補的であり、第 2 の増幅プライマーが第 2 の B K V 核酸配列に対して >90% かつ <100% 相補的である、実施形態 30~32 のいずれか 1 つの反応混合物。

【0164】

34. 第 1 の増幅プライマーおよび／または第 2 の増幅プライマーが少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 30~33 のいずれか 1 つに記載の反応混合物。

【0165】

35. 修飾ヌクレオチドが 2'-Oメチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、または 5'-メチル-2'-デオキシシトシンを含む、実施形態 34 の反応混合物。

【0166】

36. 第 2 の増幅プライマーが 1 つ以上の 5'-メチル 2'-デオキシシトシンを含む、実施形態 35 の反応混合物。

【0167】

37. 3'末端シトシンが存在する場合を除いて、第 2 の増幅プライマー中のすべてのシトシンが 5'-メチル-2'-デオキシシトシンである、実施形態 36 の反応混合物。

【0168】

38. 第 1 の増幅プライマーが 1 つ以上の 5'-メチル 2'-デオキシシトシンを含む、実施形態 35 の反応混合物。

【0169】

39. 3'末端シトシンが存在する場合を除いて、第 1 の増幅プライマー中のすべてのシトシンが 5'-メチル-2'-デオキシシトシンである、実施形態 38 の反応混合物。

【0170】

40. 実施形態 30~39 のいずれか 1 つの反応混合物であって、

a) 1 つ以上の第 1 の増幅プライマーのヌクレオチド配列が、配列番号 13、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 10、配列番号 16、配列番号 21、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 46、および配列番号 47 からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなり、

b) 1 つ以上の第 2 の増幅プライマーのヌクレオチド配列が、配列番号 14、配列番号 2、配列番号 5、配列番号 9、配列番号 12、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 22、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 48、および配列番号 49 からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなる、増幅オリゴヌクレオチド。

【0171】

41. 実施形態 30~40 のいずれか 1 つの反応混合物であって、

a) 第 1 の増幅プライマーが、配列番号 13 のヌクレオチド配列を含み、第 2 の増幅プライマーが、配列番号 14 のヌクレオチド配列を含む、

b) 第 1 の増幅プライマーが、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含み、第 2 の増幅プライマーが、配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む、

10

20

30

40

50

- c) 第1の増幅プライマーが、配列番号4のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号5のヌクレオチド配列を含む、
- d) 第1の増幅プライマーが、配列番号7のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号9のヌクレオチド配列を含む、
- e) 第1の増幅プライマーが、配列番号10のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号12のヌクレオチド配列を含む、
- f) 第1の増幅プライマーが、配列番号16のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号18のヌクレオチド配列を含む、
- g) 第1の増幅プライマーが、配列番号21のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号19のヌクレオチド配列を含む、
- h) 第1の増幅プライマーが、配列番号24のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号22のヌクレオチド配列を含む、または
- i) 第1の増幅プライマーが、配列番号25のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号26のヌクレオチド配列を含む、増幅オリゴヌクレオチド。

【0172】

42. 実施形態30～41のいずれか1つの反応混合物であって、

- a) 第1の増幅プライマーが、配列番号13のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号36および配列番号37のヌクレオチド配列を含む、
- b) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号35および配列番号36のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号14のヌクレオチド配列を含む、
- c) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号35および配列番号36のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号36および配列番号37のヌクレオチド配列を含む、
- d) 第1の増幅プライマーが、配列番号1のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号28および配列番号29のヌクレオチド配列を含む、
- e) 第1の増幅プライマーが、配列番号10のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号32および配列番号33のヌクレオチド配列を含む、
- f) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号30および配列番号31のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号12のヌクレオチド配列を含み、
- g) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号30および配列番号31のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号32および配列番号33のヌクレオチド配列を含む、
- h) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号38および配列番号39のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号18のヌクレオチド配列を含み、
- i) 第1の増幅プライマーが、配列番号21のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号40および配列番号41のヌクレオチド配列を含む、
- j) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号42および配列番号43のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号19のヌクレオチド配列を含む、
- k) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号42および配列番号43のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号40および配列番号41のヌクレオチド配列を含む、
- l) 第1の増幅プライマーが、配列番号24のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号44および配列番号45のヌクレオチド配列を含む、
- m) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号46および配列番号47のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号22のヌクレオチド配列を含む、
- n) 1つ以上の第1の増幅プライマーが、配列番号46および配列番号47のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号44および配列番号45のヌクレオチド配列を含む、または
- o) 第1の増幅プライマーが、配列番号25のヌクレオチド配列を含み、1つ以上の第2の増幅プライマーが、配列番号48および配列番号49のヌクレオチド配列を含む、増

10

20

30

40

50

幅オリゴヌクレオチド。

【0173】

43. プローブオリゴヌクレオチドが長さが21～30ヌクレオベースであり、配列番号15、配列番号3、配列番号6、配列番号8、配列番号11、配列番号17、配列番号20、配列番号23、および配列番号27からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むプローブオリゴヌクレオチドをさらに含む、実施形態30～42のいずれか1つの反応混合物。

【0174】

44. プローブオリゴヌクレオチドが、配列番号15、配列番号3、配列番号6、配列番号8、配列番号11、配列番号17、配列番号20、配列番号23、および配列番号27からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して0、1、または2個のミスマッチを有するヌクレオチド配列を含む、実施形態43の反応混合物。

10

【0175】

45. プローブオリゴヌクレオチドが第3のBKV核酸配列に90%～100%相補的である、実施形態44の反応混合物。

【0176】

46. プローブオリゴヌクレオチドが第3のBKV核酸配列に対して>90%かつ<100%相補的である、実施形態45の反応混合物。

【0177】

47. プローブオリゴヌクレオチドが少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む、実施形態43～46のいずれか1つの反応混合物。

20

【0178】

48. 修飾ヌクレオチドが2' Oメチル修飾ヌクレオチド、2' -フルオロ修飾ヌクレオチド、または5-メチル-2'-デオキシシトシンを含む、実施形態47の反応混合物。

【0179】

49. プローブオリゴヌクレオチドが1つ以上の5' -メチル-2'-デオキシシトシンを含む、実施形態48の反応混合物。

【0180】

50. プローブオリゴヌクレオチド中のすべてのシトシンが5-メチル-2'-デオキシシトシンである、実施形態49の反応混合物。

30

【0181】

51. プローブオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列が、配列番号15、配列番号3、配列番号6、配列番号8、配列番号11、配列番号17、配列番号20、配列番号23、および配列番号27からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなる、実施形態43～50のいずれか1つに記載の反応混合物。

【0182】

52. プローブオリゴヌクレオチドが検出可能な標識を含む、実施形態43～51のいずれか1つに記載の反応混合物。

【0183】

53. 検出可能な標識が蛍光分子を含有する、実施形態52の反応混合物。

40

【0184】

54. プローブオリゴヌクレオチドがクエンチャーをさらに含む、実施形態43～53のいずれか1つの反応混合物。

【0185】

55. 検出可能な標識がプローブオリゴヌクレオチドの5'末端に結合し、クエンチャーがプローブオリゴヌクレオチドの3'末端に結合している、実施形態54の反応混合物。

【0186】

56. プローブオリゴヌクレオチドが加水分解プローブである、実施形態43～55のいずれか1つの反応混合物。

【0187】

50

57. プローブオリゴヌクレオチドが長さが21～30ヌクレオベースであり、配列番号15、配列番号3、配列番号6、配列番号8、配列番号11、配列番号17、配列番号20、配列番号23、および配列番号27からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むプローブオリゴヌクレオチドを含む、反応混合物。

【0188】

58. プローブオリゴヌクレオチドが、配列番号15、配列番号3、配列番号6、配列番号8、配列番号11、配列番号17、配列番号20、配列番号23、および配列番号27からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して0、1、または2個のミスマッチを有するヌクレオチド配列を含む、実施形態57の反応混合物。

10

【0189】

59. プローブオリゴヌクレオチドが第3のBKV核酸配列に90%～100%相補的である、実施形態57または58の反応混合物。

【0190】

60. プローブオリゴヌクレオチドが第3のBKV核酸配列に対して>90%かつ<100%相補的である、実施形態57～59のいずれか1つの反応混合物。

【0191】

61. プローブオリゴヌクレオチドが少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む、実施形態57～60のいずれか1つの反応混合物。

【0192】

62. 修飾ヌクレオチドが2'-Oメチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、または5-メチル-2'-デオキシシトシンを含む、実施形態61の反応混合物。

20

【0193】

63. プローブオリゴヌクレオチドが1つ以上の5'-メチル-2'-デオキシシトシンを含む、実施形態62の反応混合物。

【0194】

64. プローブオリゴヌクレオチド中のすべてのシトシンが5-メチル-2'-デオキシシトシンである、実施形態63の反応混合物。

【0195】

65. プローブオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列が、配列番号15、配列番号3、配列番号6、配列番号8、配列番号11、配列番号17、配列番号20、配列番号23、および配列番号27からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなる、実施形態57～64のいずれか1つの反応混合物。

30

【0196】

66. プローブオリゴヌクレオチドが検出可能な標識を含む、実施形態57～65のいずれか1つの反応混合物。

【0197】

67. 検出可能な標識が蛍光分子を含有する、実施形態66の反応混合物。

【0198】

68. プローブオリゴヌクレオチドがクエンチャーをさらに含む、実施形態67のいずれか1つの反応混合物。

40

【0199】

69. 検出可能な標識がプローブオリゴヌクレオチドの5'末端に結合し、クエンチャーがプローブオリゴヌクレオチドの3'末端に結合している、実施形態68の反応混合物。

【0200】

70. プローブオリゴヌクレオチドが加水分解プローブである、実施形態57～69のいずれか1つの反応混合物。

【0201】

71. 実施形態1～13のいずれか1つの増幅オリゴヌクレオチドのいずれか、実施形態14～29のいずれか1つのプローブオリゴヌクレオチドのいずれか、および／または

50

実施形態 30～70 のいずれか 1 つの反応混合物のいずれかと、使用のための説明書と、を備えるキット。

【0202】

72. B K V 陽性対照核酸および陰性対照核酸のうちの 1 つ以上をさらに備える、実施形態 71 のキット。

【0203】

73. B K V 核酸配列を増幅する方法であって、B K V 核酸配列を含むまたは含むと疑われるサンプルを実施形態 1～13 のいずれか 1 つの増幅オリゴヌクレオチドと接触させることと、核酸増幅反応を実施することと、を含む、B K V 核酸配列を増幅する方法。

【0204】

74. 核酸増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を含む、実施形態 73 の方法。

【0205】

75. B K V 核酸配列を検出する方法であって、B K V 核酸配列を含む、または含むことが疑われるサンプルを、実施形態 24～29 のいずれか 1 つのプローブオリゴヌクレオチドと接触させることと、プローブオリゴヌクレオチドからのシグナルを検出することと、を含む、B K V 核酸配列を検出する方法。

【0206】

76. B K V を検出する方法であって、B K V を含むまたは含むことが疑われるサンプルを、実施形態 1～13 のいずれか 1 つの増幅オリゴヌクレオチドおよび実施形態 14～29 のいずれか 1 つのプローブオリゴヌクレオチドと接触させることと、核酸増幅反応を実施することと、を含む、B K V を検出する方法。

【0207】

77. 等温核酸増幅反応が、P C R を含む、実施形態 76 に記載の方法。

【0208】

78. プローブオリゴヌクレオチドを使用して、増幅された B K V アンプリコンの存在または不在を検出する、実施形態 76 または 77 の方法。

【0209】

79. 増幅された B K V アンプリコンの存在または不在が定量的 P C R を含む、実施形態 78 の方法。

【0210】

80. 定量的 P C T がリアルタイムで分析される、実施形態 79 の方法。

【0211】

81. 定量的 P C R が T a q M a n (商標) (加水分解プローブ) P C R を含む、実施形態 80 の方法。

【0212】

82. 反応混合物が、1 つ以上の D N A ポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオチド、陽性対照核酸、陰性対照核酸、内部対照核酸、K C l、M g C l₂、酢酸カリウム、緩衝液、B S A、スクロース、トレハロース、D M S O、ベタイン、ホルムアミド、グリセロール、ポリエチレングリコール、非イオン性洗浄剤、アンモニウムイオン、E D T A、対象増幅オリゴヌクレオチドをさらに含む、実施形態 30～70 のいずれか 1 つの反応混合物。

【0213】

実施例

実施例 1. B K V 増幅及び検出。B K V の塩とオリゴマーとの様々な濃度の組み合わせを評価して、好適な条件の増幅を決定した。増幅プライマー、プローブオリゴヌクレオチド、K C l、および M g C l₂ 混合物を混合することによって、P P R (再構成緩衝液 (r e c o n b u f f e r) を含有するプライマープローブ) 混合物を作製した。以下の混合物を作製して、B K V の増幅および検出に使用した。

10

20

30

40

50

【表 4】

表 1－1．反応（PPR）ミックス中のオリゴヌクレオチドおよびMgCl₂。

要因	レベル ミディアム (M)		
	低 (L)		高 (H)
増幅プライマー濃度 (μM)	0.4	0.7	1
プローブオリゴヌクレオチド濃度 (μM)	0.2	0.5	0.8
MgCl ₂	2	4	6
MgCl ₂ 濃 (mM) PPRミックスからのPCRT	1.92	3.92	5.92

10

【表 5】

表 1－2 PPRミックス中のKCl及びTris。

要因	[初期]	単位	[最終]	再構成における濃度 (1.25×)	1× (μL)	216.0
KCl	2000	mM	65	81.25	1.86	402.2
Tris, pH8.0	1000	mM	5	6.25	0.29	61.9
水					26.68	5763.9
成分の総量:					28.83	6228.0
反応あたりの総PPR量					45.83	

20

【表 6】

表 1－3．最終PPRミックス、成分あたりの量。

	μL
KCl／Trisミックス	28.83
増幅プライマーミックス	10
プローブオリゴヌクレオチドミックス	5
MgCl ₂ ミックス	2

30

40

50

【表 7】

表1ー4. PPR最終ミックス。														
PPR番号	ミックス (P r i /P r o /M g)	PPRあた りの複製数	H	M	L	H	M	L	H	M	L	KC1/T r i s ミックス	PPR管中 の合計μ L	試験PCRあたりの 量 (μ L)
PPR01	HHM	12	120			60				24		346.0	550	45.83
PPR02	HML	12	120				60				24	346.0	550	45.83
PPR03	HLM	12	120					60		24		346.0	550	45.83
PPR04	LHM	12			120	60				24		346.0	550	45.83
PPR05	HMH	12	120				60		24			346.0	550	45.83
PPR06	MLL	12		120				60			24	346.0	550	45.83
PPR07	LML	12			120		60				24	346.0	550	45.83
PPR08	LLM	12			120			60		24		346.0	550	45.83
PPR09	MHL	12		120		60					24	346.0	550	45.83
PPR10	MLH	12		120				60	24			346.0	550	45.83
PPR11	LMH	12			120		60		24			346.0	550	45.83
PPR12	MHH	12		120		60			24			346.0	550	45.83
PPR13	MMM	36		360			180			72		1038.0	1650	45.83

P r i =増幅ライナー、 P r o =プロプライエタリオチド、 M g =M g C l 2

P r i =増幅プライマー、P r o =ローディングボクスレオチド、M g =M g C l 2

10

20

30

40

50

【表 8】

表 1－5．増幅プライマーミックス

	L	M	H
増幅プライマーの濃度 (μM)	0.4	0.7	1
増幅プライマーの1.25倍濃度 (μM)	0.5	0.875	1.25
そのプライマー濃度での条件の数 (PPR)	4	5	4
必要な複製の数	48	84	48
超過係数	1.2	1.2	1.2
必要な複製*超過	57.6	101	57.6
必要な複製合計 (四捨五入した複製の数)	58	101	58
試験あたりのPPRの量 (μL)	45.83	45.83	45.83
成分の量 (μL)	10	10	10
総必要量 (μL)	580	1010	580

10

【表 9】

表 1－6．増幅プライマーミックス

配列番号	ストック濃度 (μM)	L	M	H	合計 必要 (μL)
		量 (μL)	量 (μL)	量 (μL)	
13	136.70	9.72	29.63	24.31	63.66
14	191.07	6.96	21.20	17.39	45.54
53	223.29	5.95	18.14	14.88	38.97
54	254.55	5.22	15.91	13.05	34.19
	水	552.15	925.12	510.37	1987.64
総必要量 (μL)		580.00	1010.00	580.00	

20

【表 10】

表 1－7．プローブオリゴヌクレオチドミックス

配列番号	ストック濃度 (μM)	L	M	H	総必要 (μL)
		量 (μL)	量 (μL)	量 (μL)	
15	125.82	5.28	22.99	21.13	49.40
55	130.81	5.08	22.12	20.32	47.52
	水	279.64	459.89	248.55	988.08
総必要量 (μL)		290	505	290	

30

40

50

【表 1 1】

表 1-8. Mg ミックス

	L	M	H
PCRにおけるMgCl ₂ 最終濃度 (MM)	2	4	6
PPRからのPCRにおけるMgCl ₂ (mM) の濃度	1.92	3.92	5.92
1.25×濃度のMgCl ₂ (mM)	2.4	4.9	7.4
そのプライマー濃度での条件の数 (PPR)	4	5	4
必要な複製の数	48	84	48
超過係数	1.2	1.2	1.2
必要な複製の数*超過	57.6	100.8	57.6
必要な複製合計 (四捨五入した複製の数)	58	101	58
試験あたりのPPRの量 (μL)	45.83	45.83	45.83
成分の量 (μL)	2	2	2
総必要量 (μL)	116	202	116

10

【表 1 2】

表 1-9. Mg ミックス

		L	M	H
	濃度 (MM)	量 (μL)	量 (μL)	量 (μL)
MgCl ₂ ミックス	1000.0	6.4	22.7	19.7
水		109.6	179.3	96.3
総必要量 (μL)		116	202	116

20

【表 1 3】

表 1-10A. BKVプラスミドの調製、初期希釈

ストック濃度 (cp/μL)	最終濃度 (cp/μL)	ストック量 (μL)	STM (μL)	最終必要量 (μL)
1.00×10^6	1.00×10^4	10.0	990.0	1000
1.00×10^4	1.00×10^2	120.0	11880.0	12000

30

【表 1 4】

表 1-10B. PPRミックスを用いて試験するためにBKVプラスミドを1000cp/rxnに希釈した。

開始濃度 (cp/μL)	rxn 5 μL あたりの 試験量 (cp)	サンプル管中 のcp/μL	開始量 (μL)	STM (μL)	最終量 (μL)
100.00	1000	27.78	10555.6	27444.4	38000

40

50

【表 1 5】

表 1－1 1．オリゴヌクレオチドの説明

配列番号	配列 5'→3'	修飾
1 3	CCCTACTTGAGCCAARGAAC TAA	
1 4	GGCCTAACWCCTCAAACATA TGC	7 5-Me-dC
1 5	TTAAAGCAGCAAACCCAGCA ATAGCC	7 5-Me-dC、 5' CalRed 610、3' BHQ 2
5 3	ATGGTCAATTAGAGACAAAG	なし
5 4	CGTTCACTATTGGTCTCTGC	なし
5 5	CGGAATCACAAAGTCAATCAT CGCGCA	5' Q705、3' BHQ 2

10

20

30

40

50

【表 1 6】

表 1—1 2 A. 結果、ROXチャネル											
条件	POS	平均 Ct	SD Ct	平均 RFU	SD RFU	平均 バックグラウンド	SD バックグラウンド	平均 T分配	SD T分配	シグナル： ノイズ	
HMM	12	29.07	0.13	21048.87	791.23	2320.58	129.70	302.49	67.52	9.07	
HML	12	29.41	0.09	14388.70	1062.23	2846.54	190.24	299.00	19.14	5.05	
HLM	12	30.11	0.10	7006.31	452.79	683.07	45.33	353.62	41.05	10.26	
LHM	12	29.19	0.22	13956.79	881.57	2623.40	210.03	278.70	42.20	5.32	
HMH	12	29.51	0.13	15207.90	1185.05	1059.25	76.65	289.16	20.22	14.36	
MLL	12	30.20	0.09	6469.95	306.83	1197.30	65.43	359.57	23.44	5.40	
LML	12	29.63	0.12	10301.24	501.89	2854.22	238.95	261.96	18.94	3.61	
LM	12	30.05	0.09	6560.78	321.18	707.04	57.56	296.27	66.62	9.28	
MHL	12	29.10	0.17	18695.12	996.97	4671.39	227.75	311.36	57.92	4.00	
MLH	12	30.08	0.11	6511.82	536.14	472.87	40.83	316.25	53.34	13.77	
LMH	12	29.43	0.10	11323.18	673.93	1111.18	97.62	286.10	17.45	10.19	
MHH	12	29.30	0.14	16429.40	1203.24	1594.82	99.97	315.17	17.62	10.30	
L.L.	36	29.36	0.13	16177.20	1153.58	1751.66	115.79	317.60	28.27	9.24	

10

20

30

40

50

【表 1 7】

表 1. 1 2 A. 結果、Red667チャネル

条件	POS	平均 Ct	SD Ct	平均 RFU	SD RFU	平均 バックグラウンド	SD バックグラウンド	平均 T分配	SD T分配	シグナル: ノイズ
HHM	12	26.82	0.24	19472.37	3509.94	7484.93	1419.10	348.94	83.78	2.60
HML	12	27.49	0.14	7250.95	593.47	7037.47	452.16	322.77	24.99	1.03
HLM	12	27.39	0.17	5407.57	793.76	1970.84	289.36	320.31	27.85	2.74
LHM	12	26.78	0.14	14514.50	906.14	9386.14	804.22	298.87	53.92	15.5
HMH	12	26.63	0.09	17266.52	1063.80	4367.43	237.61	303.16	15.49	3.95
MLL	12	27.66	0.29	4363.82	843.30	3366.98	663.78	313.24	48.36	1.30
LML	12	28.90	0.50	6083.03	342.20	7081.89	538.62	289.50	38.72	0.86
LM	12	27.34	0.14	5474.85	669.99	2016.46	267.73	317.24	25.57	2.72
MHL	12	27.28	0.10	12119.97	744.14	14859.62	750.66	389.98	29.57	0.82
MLH	12	26.91	0.11	7096.06	655.91	1896.94	142.79	279.78	53.24	3.74
LMH	12	26.89	0.25	11437.30	2050.26	3801.42	744.37	332.56	54.46	3.01
MHH	12	27.11	0.13	15299.03	601.51	4725.17	237.46	383.95	44.03	3.24
LLL	36	26.75	0.25	16413.01	2313.01	6133.99	813.54	347.35	53.18	2.68

【0 2 1 4】

結論：BKV増幅プライム／プローブオリゴヌクレオチドは、幅広いプライム、プローブオリゴヌクレオチド、およびMgCl₂濃度にわたり、CtおよびRFU応答において堅牢性を示した。試験した濃度範囲にわたって有効であるが、0.6 μMの増幅プライマー、0.4 μMのプローブオリゴヌクレオチド、および4 mMのMgCl₂を最も後続の試験に使用した。Ctは、試験した全ての条件に対して、およびMgCl₂濃度の広い範囲にわたって一貫している。ベースラインの蛍光及び最終的なRFUは、予想通りプローブオリゴヌクレオチド濃度の影響を受けた。

【0 2 1 5】

10

20

30

40

50

実施例 2 . B K V 増幅／検出オリゴヌクレオチドスクリーン。B K V の増幅および検出のため、さまざまな組み合わせの B V K オリゴヌクレオチドを評価した。B K ウイルスまたはプラスミドをさまざまな濃度で S T M にスパイクした。オリゴヌクレオチドのいくつかの組み合わせを組み込んだ B K P P R ミックスを評価した。

【表 1 8】

表 2－1 . P P R ミックス

P P R ミックス	増幅プライマー配列番号		プローブオリゴヌクレオチド 配列番号	使用した B K クローン
	第 1	第 2		
1	1	2	3	B K クローン 2
2	4	5	6	B K クローン 1 (6)
3	7	9	8	B K クローン 1
4	1 0	1 2	1 1	B K クローン 6 (1)
5	1 3	1 4	1 5	B K クローン 6 (1)
6	1 6	1 8	1 7	B K クローン 2 (6)
7	2 1	1 9	2 0	B K クローン 6 (1)
8	2 4	2 2	2 3	B K クローン 6 (1)
9	2 5	2 6	2 7	B K クローン 5

10

【表 1 9】

20

表 2－2 . P P R ミックスごとに処理されたサンプル

サンプル	サンプルの説明	抽出番号	P C R 複製の 数抽出ごと	最終 n
B K クローン	S T M 中の B K クローン (1 0 0 0 0 0 c p / r x n)	2	3 , 1	4
陰性対照	S T M	1	2	2

P P R あたりの総複製数 6

プラスミド希釈：

【表 2 0】

30

表 2－3 . B K プラスミド希釈、クローン 1 および 6

工程 1. 初期希釈					
ストック濃度 (c p / m L)	最終濃度 (c p / m L)	ストック量 (μ L)	STM (μ L)	必要量 (μ L)	
1.00×10 ⁹	1.00×10 ⁸	20.0	180.0	200	
1.00×10 ⁸	1.00×10 ⁷	40.0	360.0	400	
工程 2. STM中のレトロウイルス、必要な濃度（計算）					
開始濃度 (c p / m L)	r x n 5 μ Lあたり の試験量 (c p)	サンプル管における c p / m L	開始量 (μ L)	STM (μ L)	最終量 (μ L)
1.00×10 ⁷	10000	2777777.78	222.2	7777.8	8000

40

【表 2 1】

表 2-4. BKプラスミド希釈、クローン2および5

工程 1. 初期希釈					
ストック濃度 (c p/mL)	最終濃度 (c p/mL)	ストック量 (μ L)	STM (μ L)	必要量 (μ L)	
1.00×10 ⁹	1.00×10 ⁸	20.0	180.0	200	
1.00×10 ⁸	1.00×10 ⁷	20.0	180.0	200	
工程 2. STM中のレトロウイルス、必要な濃度 (計算)					
開始濃度 (c p/mL)	r x n 5 μ Lあたり の試験量 (c p)	サンプル管における c p/mL	開始量 (μ L)	STM (μ L)	最終量 (μ L)
1.00×10 ⁷	10000	277777.78	111.1	3888.9	4000
1.00×10 ⁵	100	2777.78	111.1	3888.9	4000

10

P C Rミックス：

【表 2 2】

表 2-5. 内部対照 (I C) オリゴミックス

配列番号	単位	ストック濃度	最終濃度	$\times 1.25$	μ L
53	μ M	177.50	0.60	0.75	2.11
54	μ M	254.60	0.60	0.75	1.47
55	μ M	113.80	0.40	0.50	2.20
				合計：	500.00

20

P P R 400 μ Lあたりの総量は425 μ Lでなくてはならず、P P Rミックスを濃縮のためにわずかに捨てる (s l i g h t l y o f f)。

【表 2 3】

表 2-6. V P 1 P P Rミックス

試薬	単位	ストック濃度	最終濃度	$\times 1.25$	μ L
配列番号 1	μ M	143.53	0.60	0.75	2.09
配列番号 2	μ M	175.10	0.60	0.75	1.71
配列番号 3	μ M	83.38	0.40	0.50	2.40
I Cオリゴミックス	$\times$	1.00	1.00	1.00	4.92
M g C l ₂	mM	1000.00	4.00	5.00	2.00
K C l	mM	2000.00	65.00	81.25	16.25
				水	395.63
				合計	425.00

30

【表 2 4】

表 2-7. V P 2-1 P P Rミックス

試薬	単位	ストック濃度	最終濃度	$\times 1.25$	μ L
配列番号 4	μ M	193.80	0.60	0.75	1.55
配列番号 5	μ M	171.58	0.60	0.75	1.75
配列番号 6	μ M		0.40	0.50	5.72
I Cオリゴミックス	$\times$		1.00	1.00	4.92
M g C l ₂	mM	1000.00	4.00	5.00	2.00
K C l	mM	2000.00	65.00	81.25	16.25
				水	392.82
				合計	425.00

40

50

【表 2 5】

表 2-8. VP 2-2 PPRミックス

試薬	単位	ストック濃度	最終濃度	× 1.25	μ L
配列番号 7	μ M	1 4 7.4 4	0.6 0	0.7 5	2.0 3
配列番号 8	μ M	7 1.4 8	0.6 0	0.7 5	4.2 0
配列番号 9	μ M	1 5 8.4 4	0.4 0	0.5 0	1.2 6
I C オリゴミックス	×	1.0 0	1.0 0	1.0 0	4.9 2
M g C l ₂	mM	1 0 0 0.0 0	4.0 0	5.0 0	2.0 0
K C l	mM	2 0 0 0.0 0	6 5.0 0	8 1.2 5	1 6.2 5
				水	3 9 4.3 4
				合計	4 2 5.0 0

10

【表 2 6】

表 2-9. VP 2-3 PPRミックス

試薬	単位	ストック濃度	最終濃度	× 1.25	μ L
配列番号 1 0	μ M	1 5 7.3 4	0.6 0	0.7 5	1.9 1
配列番号 1 1	μ M	5 9.2 4	0.6 0	0.7 5	5.0 6
配列番号 1 2	μ M	1 4 8.5 5	0.4 0	0.5 0	1.3 5
I C オリゴミックス	×	1.0 0	1.0 0	1.0 0	4.9 2
M g C l ₂	mM	1 0 0 0.0 0	4.0 0	5.0 0	2.0 0
K C l	mM	2 0 0 0.0 0	6 5.0 0	8 1.2 5	1 6.2 5
				水	3 9 3.5 2
				合計	4 2 5.0 0

20

【表 2 7】

表 2-10. VP 2-4 PPRミックス

試薬	単位	ストック濃度	最終濃度	× 1.25	μ L
配列番号 1 3	μ M	1 3 9.7 0	0.6 0	0.7 5	2.1 9
配列番号 1 5	μ M	1 2 5.8 2	0.6 0	0.7 5	2.3 8
配列番号 1 4	μ M	1 9 1.0 7	0.4 0	0.5 0	1.0 5
I C オリゴミックス	×	1.0 0	1.0 0	1.0 0	4.9 2
M g C l ₂	mM	1 0 0 0.0 0	4.0 0	5.0 0	2.0 0
K C l	mM	2 0 0 0.0 0	6 5.0 0	8 1.2 5	1 6.2 5
				水	3 9 6.2 1
				合計	4 2 5.0 0

30

【表 2 8】

表 2-11. VP 2-5 PPRミックス

試薬	単位	ストック濃度	最終濃度	× 1.25	μ L
配列番号 1 6	μ M	1 8 0.3 5	0.6 0	0.7 5	1.6 6
配列番号 1 7	μ M	9 1.6 5	0.6 0	0.7 5	3.2 7
配列番号 1 8	μ M	1 7 0.0 7	0.4 0	0.5 0	1.1 8
I C オリゴミックス	×	1.0 0	1.0 0	1.0 0	4.9 2
M g C l ₂	mM	1 0 0 0.0 0	4.0 0	5.0 0	2.0 0
K C l	mM	2 0 0 0.0 0	6 5.0 0	8 1.2 5	1 6.2 5
				水	3 9 5.7 2
				合計	4 2 5.0 0

40

50

【表 2 9】

表 2-12. VP2-6 PPRミックス

試薬	単位	ストック濃度	最終濃度	×1.25	μL
配列番号19	μM	163.04	0.60	0.75	1.84
配列番号20	μM	64.90	0.60	0.75	4.62
配列番号21	μM	160.88	0.40	0.50	1.24
ICオリゴミックス	×	1.00	1.00	1.00	4.92
MgCl ₂	mM	1000.00	4.00	5.00	2.00
KCl	mM	2000.00	65.00	81.25	16.25
				水	394.13
				合計	425.00

10

【表 3 0】

表 2-13. VP2-7 PPRミックス

試薬	単位	ストック濃度	最終濃度	×1.25	μL
配列番号22	μM	170.91	0.60	0.75	1.76
配列番号23	μM	110.52	0.60	0.75	2.71
配列番号24	μM	223.08	0.40	0.50	0.90
ICオリゴミックス	×	1.00	1.00	1.00	4.92
MgCl ₂	mM	1000.00	4.00	5.00	2.00
KCl	mM	2000.00	65.00	81.25	16.25
				水	396.47
				合計	425.00

20

【表 3 1】

表 2-14. LT PPR混合物

試薬	単位	ストック濃度	最終濃度	×1.25	μL
配列番号25	μM	167.3	0.60	0.75	1.79
配列番号26	μM	160.35	0.60	0.75	1.87
配列番号27	μM	85.37	0.40	0.50	2.34
ICオリゴミックス	×	1.00	1.00	1.00	4.92
MgCl ₂	mM	1000.00	4.00	5.00	2.00
KCl	mM	2000.00	65.00	81.25	16.25
				水	395.83
				合計	425.00

30

40

50

【表 3 2】

表 2-15. オリゴ情報-説明

配列 番号	配列 5'→3'	修飾	OD	濃度 (μM)
1	CTAGAACTTCTACTCCTCTTTTATTA	7 5-Me-dCs	29.5	143.53
2	GGCCCCAACMAAAAGAAAAGG	5 5-Me-dC	28.6	175.10
3	GGCTTTTTTGGGAGCTGCCCCCTGGA	5' CalRed610, 3' BHQ2	17.9	83.38
4	GCAGCAAACCCAGCAATAGC		29.5	193.80
5	CCTTGCTACTGTAGAGGGCATAAC	6 5-Me-dCs	31.9	171.58
6	AGCACCAGCAATTACAGCATATGTTTGAG G	6 5-Me-dC, 5' CalRed610, 3' BHQ2	9.2	34.99
7	GACTCTGTAAAAGACTCCTAGGTAAG		29.5	147.44
8	ATGGGTGCTGCTCTAGCACTTTTGGG	5 5-Me-dC, 5' CalRed610, 3' BHQ2	16.6	71.48
9	GCAGCAGCCTCAGATACACTGGC		27.8	158.44
10	TTAGTTCYTTGGCTCAAGTAGGG		27.9	157.34
11	ATTGGGATCACAAAGTTTCCACTGTAGGC	6 5-Me-dC, 5' CalRed610, 3' BHQ2	15.1	59.24
12	GGGTAAACAATTCCAAGGCCATGCC		29.5	148.55
13	CCCTACTTGAGCCAAARGAACTAA		23.9	136.70
15	TTAAAGCAGCAAACCCAGCAATAGCC	7 5-Me-dC, 5' CalRed610, 3' BHQ2	29	125.82
14	GGCCTAACWCCTCAAACATATGC	7 5-Me-dCs	33.7	191.07
16	CCTTTTCTTTTKGTTGGGGC		27.5	180.35
17	ACAGTCCCGTACAGGCCTAGAAG	7 5-Me-dC, 5' CalRed610, 3' BHQ2	19.1	91.65
18	AAAAC TATTGCCCCAGGAGGTGCT		31.3	170.07
19	TTAGTTCYTTGGCTCAAGTAGGGTA	3 5-Me-dC,	31.6	163.04
20	GCCTACAGTGGAACCTTTGTGATCCCAAT	7 5-Me-dC, 5' CalRed610, 3' BHQ2	16.5	64.90
21	GGGTAAACAATTCCAAGGCCAT		28.3	160.88
22	CCCTACTTGAGCCAAARGAACTAA	7 5-Me-dC	30.3	170.91
23	GGCTATTGCTGGGTTTGCTGCTTTAA	4 5-Me-dC, 5' CalRed610, 3' BHQ2	25.6	110.52
24	GGCCTAACWCCTCAAACATATGC		38.8	223.08
25	GAAAGAGCTGCCTGGGGAAA		26.1	167.3
26	CTACCTTTACATCYTGCTCCATTT	8 5-Me-dC,	29.2	160.35
27	CCCTGACAAAGGGGGCGACGAGGATAAAA	5' CalRed610, 3' BHQ2	21.8	85.37

10

20

30

40

50

【表 3 3】

チャネル	標的	陽性	平均Ct	SD Ct	平均 RfU	SD RfU	平均バックグラウンド	SDバックグラウンド	平均 T勾配	SD T勾配	シグナル対ノイズ	アンプリコンシグナル
ROX	VP1	4/4	27.72	0.13	4481.96	159.12	263.51	8.79	245.89	12.34	17.01	106
ROX	VP2-1	4/4	27.42	0.12	7128.10	443.31	2078.57	117.74	261.37	13.67	3.43	117
ROX	VP2-2	4/4	26.08	0.10	10570.21	464.21	588.37	18.31	279.84	62.12	17.97	115
ROX	VP2-3	4/4	26.26	0.09	12420.68	676.59	2423.59	198.64	303.37	24.09	5.12	109
ROX	VP2-4	4/4	26.34	0.07	9733.29	431.71	1537.83	67.03	281.49	8.59	6.33	111
ROX	VP2-5	4/4	26.65	0.12	8645.25	628.92	636.67	40.83	229.77	12.82	13.58	132
ROX	VP2-6	4/4	26.61	0.21	10480.48	517.12	1459.78	55.63	253.74	27.52	7.18	109
ROX	VP2-7	4/4	26.90	0.12	9141.11	597.74	1163.53	103.44	244.36	55.06	7.86	111
	Large T	2/2	26.93	0.11	7352.34	270.85	963.34	69.99	293.09	87.18	7.63	
RED677	VP1	4/4	27.44	0.11	4259.03	420.00	1829.29	166.05	314.58	23.08	2.33	
RED677	VP2-1	4/4	27.07	0.03	6046.08	555.43	2487.54	173.28	425.23	22.02	2.43	
RED677	VP2-2	4/4	27.07	0.03	6611.05	161.20	2522.22	58.50	414.97	12.73	2.62	
RED677	VP2-3	4/4	27.83	0.39	3749.60	860.11	1644.92	372.31	295.18	25.28	2.28	
RED677	VP2-4	4/4	27.85	0.12	3579.26	172.71	1548.29	76.69	286.01	54.56	2.31	
RED677	VP2-5	4/4	27.82	0.04	3437.52	155.84	1450.19	66.80	252.31	7.34	2.37	
RED677	VP2-6	4/4	27.52	0.15	5254.34	224.51	2051.39	42.89	304.07	22.45	2.56	
RED677	VP2-7	4/4	28.84	0.18	1530.25	177.66	763.74	82.90	218.17	17.91	2.00	
	Large T	4/4	26.60	0.01	9414.63	616.55	3393.78	285.66	304.70	2.97	2.77	

【0 2 1 6】

結論：すべての増幅プライマー／プローブオリゴヌクレオチドデザインは、試験した B K V プラスミドを増幅および検出した。10 コピー／反応 (c p r) まで試験したすべての濃度で、S T M の B K ウイルスとプラスミドが 100 % 検出された。P C R 効率は高く、直線性プロットで示されるように、R 2 値は 0.99 を超え、傾きは -3.4 または -3.5 であった。内部対照は 100 % 検出された。

【0 2 1 7】

実施例 3. B K V 増幅および検出特異性増幅オリゴヌクレオチドを、臓器移植サンプルに共通の他の生物を試験することによって標的の特異性を決定するために評価した。B K

10

20

30

40

50

ウイルス培養液を陽性対照として使用した。血液または尿に一般的に見られる 42 の生物を、STMに1E6 cp/mLにできるだけ近づけて（入手可能性に応じて）スパイクすることにより、10のパネルで調製した。各パネルの特異性を評価した。

【表34】

表3-1. 概要

PPRミックス	増幅プライマー配列番号		プローブ オリゴヌクレオチド 配列番号	標的領域
	フォワード	リバース		
1	13	14	15	BK VP2 遺伝子

10

【表35】

表3-2. サンプル.

サンプル	サンプルの説明	濃度 (cp/rxn)	抽出 数	抽出あたりの PCR複製 数	最終n
既製の特異性パネル	説明については、 表3-6を参照されたい。	該当せず	1	3	3
オリゴヌクレオチドパネル	PPRミックス1	該当せず	1	3	3
BKプラスミド	STMにおける BKプラスミド	1000	1	3	3
陰性対照	陰性対照 (STM)	該当せず	1	3	3

20

PPRあたりの合計複製物=30

【表36】

表3-4. PPRミックス

名称	配列番号	単位	ストック濃度	最終濃度	×1.25	μL
BK VP2 FP04	13	μM	136.70	0.60	0.75	5.76
BL VP2 RP04	14	μM	191.07	0.60	0.50	2.75
BL VP2 PR04	15	μM	125.85	0.40	0.75	6.26
SCR-F03 (IC)	53	μM	223.29	0.60	0.75	3.53
SCR-R03 (IC)	54	μM	254.55	0.60	0.75	3.09
SCR-プローブ03a (IC)	55	μM	130.81	0.40	0.75	6.02
Tris, pH8.0		mM	1000.00	5.00	6.25	6.56
MgCl2		mM	1000.00	4.00	5.00	5.25
KCl		mM	2000.00	65.00	81.25	42.66
水						968.12
合計:						1050.00

30

【表37】

表3-5. オリゴヌクレオチドタイプ

配列番号	配列 5'→3'	修飾
BKV標的		
13	CCCTACTTGAGCCAARGAACTAA	なし
14	GGCCTAACWCCTCAAACATATGC	7' 5-Me-dCs
15	TTAAAGCAGCAAACCCAGCAATAGCC	7' 5-Me-dC、 5' CalRed610、 3' BHQ2
IC標的		
53	ATGGTCAATTAGAGACAAAG	なし
54	CGTTCCTACTATTGGTCTCTGC	なし
55	CGGAATCACAAAGTCAATCATCGCGCA	5' Q705、3' BHQ2

40

50

【0218】

結論：BKVオリゴヌクレオチドは、試験したすべての生物に対して非反応性であった。オリゴヌクレオチドは、チャレンジ生物のいずれも増幅または検出しなかった。したがって、BKVオリゴヌクレオチドはBKVに特異的である。さらに、ThermoBLAST（商標）インシリコ分析は、標的BKV領域の333BKV基準ゲノムの包括性を予測した。特異性分析を、ヒトゲノムとともに、いくつかのウイルス、細菌、環境、無脊椎動物、および植物のゲノムで実施した。結果は、BKVオリゴヌクレオチドの非特異的ゲノムへのハイブリダイゼーションおよび非標的アンプリコンの増幅を示さなかった。すべての試験で内部対照が検出された。陽性対照試験は、BKVおよびICについて陽性であり、陰性対照試験はICのみについて陽性であった。

10

【0219】

BKVの反応性を、特異性研究からの生物の存在下で評価した。簡単に説明すると、特異性研究のパネル2～8をSTMで1：10に希釈し、BKVを1000cprでスパイクした。パネル1、9、10、および11を、STMで新たに調製し、BKVを同じ濃度でスパイクした。EBV干渉を評価するために、EBVも各パネルへとスパイクした。表1および表2に記載されている増幅プライマーおよびプローブオリゴヌクレオチドを含むPCR製剤を使用して、4～5種の一般的に見られる生物の存在下で各パネルのBKV性能を評価した。実験の詳細はSD-JYF-000019に記載されている。パネルの組成および反応性の結果を表14および図12に示す。結果を、STMにおいて1000cprのBKVからなる陽性対照と比較した。BKVは、陽性対照と比較した場合、0.5Ct以下のシフトを伴って、パネルの100%で検出された。内部対照は、パネルの100%において検出された。陽性対照試験は、BKVおよびICについて陽性であり、陰性対照試験はICのみについて陽性であった。

20

30

40

50

10

20

30

40

50

表3-6. BKV特異性の結果

パネル	微生物	株	ATCC/PN数	最終濃度	単位	反応性
	バリセラ・ズスターウイルス (VZV) 分離株A培養液	分離株A	0810172CF	1.00×10 ⁵	cFU/mL	0/3=0%
	エズスウイルス (EBV) 培養液	B95-8	0810008CF	1.00×10 ⁴	cFU/mL	
	NATfolicトリスウイルスB19	B19	NATPARVO-0003	1.00×10 ⁵	IU/mL	
1	CMV	RC256	0810003CF	1.00×10 ⁴	TCID50/mL	0/3=0%
	JCウイルスDNA	MAD1	17-943-500	1.00×10 ⁵	cFU/mL	
	カンジダ・アルビカンズ (Candida albicans)	CBSS562	18804	1.00×10 ⁶	CFU/mL	
2	クラミジア・トラコーチス (Chlamydia trachomatis) -血清型E	血清型E	VR-348B	1.00×10 ⁴	IFU/mL	0/3=0%
	A型肝炎ウイルス、HML7.5株	B型	該当せず	1.00×10 ⁵	cFU/mL	
	デングウイルス1型培養液	HMI75	VR-2093	1.43×10 ⁵	TCID50/mL	
3	デングウイルス2型培養液	ハライ	0810088CF	1.43×10 ⁴	TCID50/mL	0/3=0%
	デングウイルス3型培養液	ニューギニアC	0810089CF	1.43×10 ⁴	TCID50/mL	
	デングウイルス4型培養液	H87	0810090CF	1.43×10 ⁴	TCID50/mL	
4	単純ヘルペスウイルス2型 (HSV-2) 株MS	H241	0810091CF	1.43×10 ⁴	TCID50/mL	0/3=0%
	HIV2型 (HIV-2) 培養液	MS	該当せず	1.43×10 ⁴	TCID50/mL	
	HIV2型 (HIV-2) 培養液	N1H-Z	0810029CF	1.43×10 ⁴	TCID50/mL	
5	HPVタイプ18精製フラグミDNA	18型	45152D	1.00×10 ⁴	cFU/mL	0/3=0%
	合成ヒトシロペウイルス16 DNA	16型	VR-3240SD	1.00×10 ⁴	cFU/mL	
	ヒトヘルペスウイルス6A型 (HHV-6A) (株:GS) 培養液	GS	0810529CF	1.00×10 ⁴	cFU/mL	
6	ヒトヘルペスウイルス6B型 (HHV-6B) (株:Z29) 培養液	Z29	0810072CF	1.00×10 ⁴	cFU/mL	0/3=0%
	ヒトヘルペスウイルス7型 (HHV-7)	SB	0810071CF	1.43×10 ⁴	TCID50/mL	
	ヒトヘルペスウイルス8型 (HHV-8) 培養液	該当せず	0810104CF	1.00×10 ⁵	cFU/mL	
7	ヒトTリンパ同型ウイルス1型 (HTLV-1) 培養液	該当せず	0801033CF	1.00×10 ⁴	vFU/mL	0/3=0%
	ヒトTリンパ同型ウイルスII型 (HTLV-II) 培養液	該当せず	0810039CF	1.00×10 ⁴	vFU/mL	
	ヒトB型肝炎ウイルス (HBV)	該当せず	NATHBV-0003	1.00×10 ⁴	cFU/mL	
	ヒトC型肝炎ウイルス (HCV)	該当せず	NATHCV-0005	1.00×10 ⁴	cFU/mL	0/3=0%
	マイコプラズマ・スミタチス (Mycobacterium smegmatis)	W-113	14468	1.00×10 ⁶	CFU/mL	
	ナイセリヤ・ゴノレア (Neisseria gonorrhoeae)	NCTC8375	19424	1.00×10 ⁶	CFU/mL	
	プロピオニバクテリウム・アケネス (Propionibacterium acnes)	NCTC737	6919	1.00×10 ⁶	CFU/mL	0/3=0%
	スタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus)	NCTC8532	12600	1.00×10 ⁴	CFU/mL	

【表38-1】

【表 3 8 - 2】

8	NAT101ウイルスワクチン (WNV) 株: NY 2001-6263	NY 2001-6263	NATH CV-0005	5.00×10 ³	c p/mL	0/3=0%
	ワクチン培養液	「ワクチン」	0810310CF	0.00	TCID50/mL	
	トリコモナス・ヴァギナリス (Trichomonas vaginalis)	JH 31A#4	30236	1.00×10 ⁶	細胞/mL	
	スタフィロコッカス・エピデルミシス (Staphylococcus epidermidis)	RP62A	35984	1.00×10 ⁶	CFU/mL	
	HSV-1株MacIntyre	MacIntyre	VR-539	1.43×10 ⁴	TCID50/mL	
9	マイコバクテリウム・ゴルドナ (Mycobacterium gordonae)	L. Wayne W-1609	14470	1.00×10 ⁶	c p/mL	0/3=0%
	アシネトバクター・イオファイ (Acinetobacter Iwoffii)	GP0714	15309	1.00×10 ⁶	CFU/mL	
	エントロバクター・クロア (Enterobacter cloacae)	GP0130	13047	1.00×10 ⁶	CFU/mL	
	エシエリキア・コリ (Escherichia coli)	GP0014	11775	1.00×10 ⁶	CFU/mL	
	クレブシエラ・ニューモニア (Klebsiella pneumoniae)	GP0040	23357	1.00×10 ⁶	CFU/mL	
10	プロテウス・ミラビリス (Proteus mirabilis)	GP0110	29906	1.00×10 ⁶	CFU/mL	0/3=0%
	シュードモナス・アエリギノサ (Pseudomonas aeruginosa)	GP0736	10145	1.00×10 ⁶	CFU/mL	
	ストレプトコッカス・ガラクトサイ (Streptococcus agalactiae)	GP0744	13813	1.00×10 ⁶	CFU/mL	

10

20

30

40

50

【表 3 9 - 1】

表 3 - 7. B K V 特異性の結果

微生物	最終濃度	単位	反応性
BKウイルス培養液	2.78×10^4	c p / m L	1 / 1 = 100 %
CMV	1.43×10^5	T C I D 5 0 / m L	
NAT t r o l と ヒトパルボウイルス B 1 9	1.00×10^5	I U / m L	
バリセラ・ズスターウイルス (V Z V) 分離株 A 培養液	1.00×10^6	c p / m L	
BKウイルス培養液	2.78×10^4	c p / m L	1 / 1 = 100 %
カンジダ・アルビカンス (<i>Candida albicans</i>)	1.00×10^6	C F U / m L	
クラミジア・トラコマチス (<i>Chlamydia trachomatis</i>) - 血清 E 型	1.00×10^6	I F U / m L	
培養ウイルス、H I V - 1 B 型	1.00×10^5	c p / m L	
A 型肝炎ウイルス、H M 1 7 5 株	1.43×10^5	T C I D 5 0 / m L	1 / 1 = 100 %
BKウイルス培養液	2.78×10^4	c p / m L	
デングウイルス 1 型培養液	1.43×10^4	T C I D 5 0 / m L	
デングウイルス 2 型培養液	1.43×10^4	T C I D 5 0 / m L	
デングウイルス 3 型培養液	1.43×10^5	T C I D 5 0 / m L	1 / 1 = 100 %
デングウイルス 4 型培養液	1.43×10^4	T C I D 5 0 / m L	
BKウイルス培養液	2.78×10^4	c p / m L	
単純ヘルペスウイルス 2 型 (H S V - 2) 株 M S	1.43×10^4	T C I D 5 0 / m L	1 / 1 = 100 %
H I V 2 型 (H I V - 2) 培養液	1.43×10^3	T C I D 5 0 / m L	
H P V タイプ 1 8 精製プラスミド DNA	1.00×10^6	c p / m L	
合成ヒトパピローマウイルス 1 6 DNA	1.00×10^4	c p / m L	
BKウイルス培養液	2.78×10^4	c p / m L	1 / 1 = 100 %
ヒトヘルペスウイルス 6 A 型 (株 : G S) 培養液	1.00×10^6	c p / m L	
ヒトヘルペスウイルス 6 B 型 (株 : Z 2 9) 培養液	1.00×10^6	c p / m L	
ヒトヘルペスウイルス 7 型 (H H V - 7)	1.43×10^6	T C I D 5 0 / m L	
ヒトヘルペスウイルス 8 型 (H H V - 8) 培養液	1.00×10^6	c p / m L	1 / 1 = 100 %
BKウイルス培養液	2.78×10^4	c p / m L	
ヒト T リンパ向性ウイルス I 型培養液	1.00×10^6	v p / m L	
ヒト T リンパ向性ウイルス II 型培養液	1.00×10^6	v p / m L	
NAT t r o l と ヒト B 型肝炎ウイルス (H B V)	1.00×10^4	c p / m L	1 / 1 = 100 %
NAT t r o l と ヒト C 型肝炎ウイルス (H C V)	1.00×10^4	c p / m L	
BKウイルス培養液	2.78×10^4	c p / m L	
マイコバクテリウム・スメグマチス (<i>Mycobacterium smegmatis</i>)	1.00×10^6	C F U / m L	1 / 1 = 100 %
ナイセリア・ゴノレア (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	1.00×10^6	C F U / m L	
プロピオニバクテリウム・アクネス (<i>Propionibacterium acnes</i>)	1.00×10^6	C F U / m L	
スタフィロコッカス・アウレウス (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1.00×10^6	C F U / m L	

10

20

30

40

50

【表 39-2】

BKウイルス培養液	2.78×10^4	cp/mL	1/1=100%
NATtrol ウエストナイルウイルス (WNV) 株: NY 2001-6263	5.00×10^3	cp/mL	
ワグシニアウイルス培養液	0.00×10^0	TCID50/mL	
トリコモナス・ヴァギナリス (<i>Trichomonas vaginalis</i>)	1.00×10^6	細胞/mL	
スタフィロコッカス・エピデルミディス (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	1.00×10^6	CFU/mL	
HSV-1株MacIntyre	1.43×10^4	TCID50/mL	
マイコバクテリウム・ゴルドネ (<i>Mycobacterium gordonae</i>)	1.00×10^6	cp/mL	
BKウイルス培養液	2.78×10^4	cp/mL	1/1=100%
アシネトバクター・ルオフイイ (<i>Acinetobacter lwoffii</i>)	1.00×10^6	CFU/mL	
エンテロバクター・クロアカ (<i>Enterobacter cloacae</i>)	1.00×10^6	CFU/mL	
エシエリキア・コリ (<i>Escherichia coli</i>)	1.00×10^6	CFU/mL	
BKウイルス培養液	2.78×10^4	cp/mL	
クレブシエラ・ニューモニアエ (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	1.00×10^6	CFU/mL	
プロテウス・ミラビリス (<i>Proteus mirabilis</i>)	1.00×10^6	CFU/mL	
シュードモナス・エルギノーザ (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	1.00×10^6	CFU/mL	1/1=100%
BKウイルス培養液	2.78×10^4	cp/mL	
ストレプトコッカス・アガラクティエ (<i>Streptococcus agalactiae</i>)	1.00×10^6	CFU/mL	1/1=100%

【0220】

実施例4. JC交差反応性. オリゴヌクレオチドを評価して、記載されるBKVオリゴヌクレオチドとJCウイルスDNAまたは高力価JCプラスミドとの交差反応性があるかどうかを判定した。BKVはJCウイルスと75%の相同性を共有する。インシリコ分析は、JCウイルス配列との交差反応性を示さなかった。

【表40】

表4-1. 概要

PPR ミックス	増幅プライマー 配列番号		プローブオリゴヌクレオチド 配列番号	標的領域	クローン
	第1	第2			
1	1	2	3	BK VP1遺伝子	該当なし (9試験)
2	4	5	6	BK VP2遺伝子	JC GB1
3	7	9	8	BK VP2遺伝子	該当なし (9試験)
4	10	12	11	BK VP2遺伝子	JC GB1
5	13	14	15	BK VP2遺伝子	JC GB1
6	16	18	17	BK VP2遺伝子	JC GB6
7	21	19	20	BK VP2遺伝子	JC GB1
8	24	22	23	BK VP2遺伝子	JC GB1

【表 4 1】

表 4-2. サンプル.

サンプル	サンプルの説明	濃度 (c p / r x n)	チューブ の数	抽出 番号	P C R複製の 数 抽出ごと	最終n P P Rごと
J C 単独	STMにおける J C ウイルスDNA	1 0 0 0 0	8	1	3	3
J C プラスミド	高 c p r のプラスミド	1 0 0 0 0 0 0	8	1	3	3
B K 単独	B K C F	1 0 0	8	1	3	3
陰性対照	STM	該当せず	8	1	3	3
P P Rあたりの総複製数			9 6			

10

【表 4 2】

表 4-3. 設定

チャンネル	クロストーク 補正	収束 サイクル	サイクル終了 カットオフ	陽性／C T 閾値
F A M	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
H E X	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
R O X	該当せず	1 0	1 0	5 0 0
R E D 6 4 7	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
R E D 6 7 7	該当せず	1 0	該当せず	5 0 0

20

【表 4 3】

表 4-4. パネルの調製: J C プラスミド

名称	クローン I D	サンプルフォーマット	濃度 (c p / m L)
J C クローン 1	1 0 0 9 7 6	線形化プラスミド	1.00×10^9
J C クローン 6	1 0 0 9 8 0	線形化プラスミド	1.00×10^9

30

【表 4 4】

表 4-5. J C サンプルの調製.

C_i (c p / m L)	C_f (c p / m L)	試験量 (c p / r x n)	V_i (μ L)	STMの μ L	V_f (μ L)	
1.00×10^9	2.78×10^7	1×10^6	97.2	3402.8	3500.00	クローン 1
1.00×10^9	2.78×10^7	1×10^6	22.2	777.8	800.00	クローン 6

【表 4 5】

表 4-6. J C ウイルスDNA

名称	M F G 番号	製造業者	サンプル フォーマット	濃度 (c p / m L)
J C ウイルスDNA、 MAD 1 株	17-943- 500/J02003	Advanced Biotechnologies	ウイルスDNA	5.20×10^6

40

50

【表 4 6】

表 4-7.

C_i (cp/mL)	C_f (cp/mL)	試験量 (cp/rxn)	V_i (μ L)	STMの μ L	V_f (μ L)
5.20×10^6	2.78×10^5	1.0×10^4	267.1	4732.9	5000.00

【表 4 7】

表 4-8. BK培養液

C_i (cp/mL)	C_f (cp/mL)	試験量 (cp/rxn)	V_i (μ L)	STMの μ L	V_f (μ L)
1.00×10^5	2.78×10^3	1.0×10^2	138.9	4861.1	5000.00

【表 4 8】

PCRミックス:

表 4-9. ICオリゴミックス

名称	単位	ストック濃度	最終濃度	$\times 1.25$	μ L
50 $\times$ DNA IC増幅プライマーミックス	$\times$	50.00	1.00	1.00	99.00
50 $\times$ DNA ICプローブオリゴヌクレオチド	$\times$	50.00	1.00	1.00	99.00
Tris, pH8.0	mM	1000.00	5.00	6.25	30.94
MgCl ₂	mM	1000.00	4.00	5.00	24.75
KCl	mM	2000.00	65.00	81.25	201.09
合計					454.78

必要なIC試験合計 72
ICミックス量 4950 (<約9*12 (550 μ L試験))
マルチプレックスPPRごとのICミックス 50.53

【表 4 9】

表 4-10. VP1 PPRミックス

配列番号	単位	ストック濃度	最終濃度	$\times 1.25$	μ L
1	μ M	143.53	0.60	0.75	2.87
2	μ M	175.10	0.60	0.75	2.36
3	μ M	83.38	0.40	0.50	3.30
ICオリゴミックス	$\times$	1.00	1.00	1.00	50.53
水					490.94
合計					550.00

【表 5 0】

表 4-11. VP2-1 PPRミックス

配列番号	単位	ストック濃度	最終濃度	$\times 1.25$	μ L
4	μ M	193.80	0.60	0.75	2.13
5	μ M	171.58	0.60	0.75	2.40
6	μ M	34.99	0.40	0.50	7.86
ICオリゴミックス	$\times$	1.00	1.00	1.00	50.53
水					487.08
合計					550.00

【表 5 1】

表 4-12. VP2-2 PPRミックス

配列番号	単位	ストック濃度	最終濃度	×1.25	μL
7	μM	147.44	0.60	0.75	2.80
8	μM	71.48	0.60	0.75	5.77
9	μM	158.44	0.40	0.50	1.74
ICオリゴミックス	×	1.00	1.00	1.00	50.53
水					489.16
合計:					550.00

10

【表 5 2】

表 4-13. VP2-3 PPRミックス

配列番号	単位	ストック濃度	最終濃度	×1.25	μL
10	μM	157.34	0.60	0.75	2.62
11	μM	59.24	0.60	0.75	6.96
12	μM	148.55	0.40	0.50	1.85
ICオリゴミックス	×	1.00	1.00	1.00	50.53
水					488.03
合計:					550.00

20

【表 5 3】

表 4-1. VP2-4 PPRミックス

配列番号	単位	ストック濃度	最終濃度	×1.25	μL
13	μM	136.70	0.60	0.75	3.02
15	μM	125.82	0.60	0.75	3.28
14	μM	191.07	0.40	0.50	1.44
ICオリゴミックス	×	1.00	1.00	1.00	50.53
水					491.73
合計:					550.00

30

【表 5 4】

表 4-15. VP2-5 PPRミックス

配列番号	単位	ストック濃度	最終濃度	×1.25	μL
16	μM	180.35	0.60	0.75	2.29
17	μM	91.65	0.60	0.75	4.50
18	μM	170.07	0.40	0.50	1.62
ICオリゴミックス	×	1.00	1.00	1.00	50.53
水					491.06
合計:					550.00

40

50

【表 5 5】

表 4-16. VP2-6 PPRミックス

配列番号	単位	ストック濃度	最終濃度	×1.25	μL
19	μM	163.04	0.60	0.75	2.53
20	μM	64.90	0.60	0.75	6.36
21	μM	160.88	0.40	0.50	1.71
ICオリゴミックス	×	1.00	1.00	1.00	50.53
水					488.87
合計：					550.00

10

【表 5 6】

表 4-17. VP2-7 PPRミックス

配列番号	単位	ストック濃度	最終濃度	×1.25	μL
22	μM	170.91	0.60	0.75	2.41
23	μM	110.52	0.60	0.75	3.73
24	μM	223.08	0.40	0.50	1.23
ICオリゴミックス	×	1.00	1.00	1.00	50.53
水					492.09
合計：					550.00

20

オリゴヌクレオチドは表 2-15 に記載されているとおりである。

【表 5 7】

表 4-18b. オリゴ情報-説明

標的	配列番号	配列 5'→3'	修飾
IC	53	ATGGTCAATTAGAGACAAAG	なし
	54	CGITCACTATTGGTCTCTGC	なし
	55	CGGAATCACAAGTCAATCATCGCGCA	5' Q705および 3' BHQ2

30

40

50

【表 5 8】

表4-19. 結果 (ROX)。											
標的	サンプル型	濃度 (c p r)	陽性	平均C t	SD C t	平均 RFU	SD RFU	平均 バックグラウンド	SD バックグラウンド	平均 T勾配	SD T勾配
VP1-1	BK培養液	100	3	34.03	0.22	3237.27	640.49	336.96	26.20	234.37	33.71
	JCウイルスDNA	10000						303.20	26.57		
	STM	該当せず						319.95	22.06		
VP2-1	BK培養液	100	3	34.16	0.33	7366.09	507.95	1864.50	99.04	279.73	53.48
	JCウイルスDNA	10000	1	41.81		637.58		2045.30	174.52	63.09	
	アラスミド	1000000						1992.72	55.35		
VP2-2	STM	該当せず						1870.36	115.52		
	BK培養液	100	3	33.49	0.02	9097.89	103.53	621.65	11.00	310.42	5.90
	JCウイルスDNA	10000	3	37.64	1.58	7522.62	1852.37	690.95	4.06	284.52	39.31
VP2-3	STM	該当せず						655.99	22.25		
	BK培養液	100	3	32.54	0.21	7936.63	1507.15	2385.49	55.29	270.11	38.46
	JCウイルスDNA	10000	3	37.56	1.21	1615.03	441.92	2307.23	244.75	150.40	24.75
VP2-4	アラスミド	1000000						2368.86	111.35		
	STM	該当せず						2472.71	142.75		
	BK培養液	100	3	32.75	0.19	11289.06	300.23	1897.45	6.78	271.17	24.77
VP2-5	JCウイルスDNA	10000	3	36.55	0.59	9238.87	1024.91	1872.47	154.60	339.36	15.83
	アラスミド	1000000						1858.10	17.42		
	STM	該当せず						1875.79	60.28		
VP2-6	BK培養液	100	3	34.23	0.23	7327.55	959.40	767.19	11.02	337.91	38.49
	JCウイルスDNA	10000	3	38.04	0.48	3328.47	340.76	786.71	38.00	288.84	35.45
	アラスミド	1000000	3	39.23	0.26	1217.48	245.97	737.90	63.18	152.46	19.78
VP2-7	STM	該当せず						732.26	26.43		
	BK培養液	100	3	33.11	0.48	9797.88	603.27	1727.33	97.42	310.20	47.96
	JCウイルスDNA	10000	3	38.66	1.74	5539.59	2000.05	1482.83	185.77	259.99	6.55
VP2-8	アラスミド	1000000						1746.82	157.43		
	STM	該当せず						1698.41	168.32		
	BK培養液	100	3	33.11	0.04	10503.77	417.05	1480.13	41.94	379.96	9.26
VP2-9	JCウイルスDNA	10000	3	37.51	0.80	7381.99	1345.43	1500.23	21.88	293.04	29.35
	アラスミド	1000000						1539.68	87.62		
	STM	該当せず						1522.60	118.19		

10

20

30

40

50

【表 5 9】

表 4－2 0．B K Vオリゴヌクレオチドは J C V配列とミスマッチである

標的	配列番号	J C ウイルス ミスマッチ	標的	配列番号	J C ウイルス ミスマッチ
V P 1－1	1	2	V P 2－4	1 3	8
	2	0		1 5	5
	3	> 1 0 b p 欠失		1 4	2
V P 2－1	4	2	V P 2－5	1 6	0
	5	2		1 7	3
	6	4		1 8	4
V P 2－2	7	存在しない	V P 2－6	1 9	8
	8	3		2 0	6
	9	3		2 1	4
V P 2－3	1 0	8	V P 2－7	2 2	8
	1 1	6		2 3	5
	1 2	6		2 4	2

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

表4-21. 結果 (Quasar 705)

標的	サンプル型	濃度 (cpr)	陽性	平均 Ct	SD Ct	平均RFU	SD RFU	平均 バックグラウンド	SD バックグラウンド	平均 T勾配	SD T勾配
VP1-1	BK培養液	100	3	27.49	0.08	3802.50	331.38	1289.70	111.02	288.76	13.94
	JCウイルスDNA	10000	3	27.42	0.14	3414.38	346.54	1119.54	119.97	293.25	20.55
	STM	該当せず	3	27.62	0.13	3404.00	262.82	1166.34	111.75	259.80	16.93
VP2-1	BK培養液	100	3	27.49	0.11	3489.28	262.87	1217.90	76.48	286.42	17.07
	JCウイルスDNA	10000	3	27.14	0.21	4673.51	853.00	1634.25	331.56	367.99	57.04
	プラスミド	1000000	3	26.84	0.04	4835.51	159.74	1665.00	18.99	259.15	2.29
VP2-2	STM	該当せず	3	27.72	0.10	3100.01	190.02	1123.11	38.18	254.66	13.35
	BK培養液	100	3	27.69	0.08	3033.62	141.41	1068.43	40.00	255.72	4.42
	JCウイルスDNA	10000	3	27.72	0.08	3202.49	185.78	1168.90	37.45	257.69	12.88
VP2-3	STM	該当せず	3	27.60	0.05	3176.53	151.11	1124.60	47.21	269.10	8.37
	BK培養液	100	3	27.32	0.09	3509.34	280.00	1380.34	84.80	318.71	24.35
	JCウイルスDNA	10000	3	27.19	0.08	3790.08	217.74	1447.12	123.35	354.60	22.34
VP2-4	プラスミド	1000000	3	27.26	0.10	3897.88	229.38	1474.64	67.62	350.39	25.99
	STM	該当せず	3	27.37	0.05	3582.33	72.45	1410.07	33.18	315.94	5.90
	BK培養液	100	3	27.38	0.07	3608.25	156.33	1417.92	56.17	308.65	12.92
VP2-5	JCウイルスDNA	10000	3	27.25	0.12	3726.88	159.28	1417.28	65.26	328.56	22.10
	プラスミド	1000000	3	27.25	0.02	3651.48	107.07	1377.15	38.76	326.40	1.72
	STM	該当せず	3	27.29	0.14	3547.01	233.77	1364.01	82.47	326.29	29.19
VP2-6	BK培養液	100	3	27.68	0.06	3024.80	130.89	1086.63	36.08	258.64	6.63
	JCウイルスDNA	10000	3	27.63	0.03	2964.61	69.43	1071.86	54.34	262.66	4.87
	プラスミド	1000000	3	27.65	0.08	2942.63	247.15	1048.01	120.65	260.72	9.79
VP2-7	STM	該当せず	3	27.60	0.40	3492.41	816.16	1270.88	314.75	285.01	69.69
	BK培養液	100	3	27.32	0.06	4181.99	166.74	1411.75	66.60	324.99	11.49
	JCウイルスDNA	10000	3	27.46	0.14	3872.36	476.46	1305.33	179.29	293.35	27.62
VP2-8	プラスミド	1000000	3	27.31	0.05	4079.69	255.64	1431.37	109.48	320.99	10.95
	STM	該当せず	3	27.35	0.08	3976.00	216.18	1341.58	88.16	317.14	16.63
	BK培養液	100	3	27.91	0.11	2487.85	274.21	941.76	85.52	262.50	39.60

【表60-1】

【表 6 0 - 2】

	J C ウイルス DNA	10000	3	27.50	0.35	3083.14	466.48	1171.80	193.41	290.97	52.18
	アラスミド	1000000	3	27.44	0.06	3232.58	111.05	1251.94	15.26	294.49	8.06
	STM	該当せず	3	28.08	0.45	2267.09	84.90	896.26	32.44	304.51	6.14

10

20

30

40

【 0 2 2 1】

結論：すべての B K V オリゴヌクレオチドは、J C ウイルス DNA である程度の増幅を示したが、設定された検出しきい値を超えなかったものもあった。この低レベルの検出は、J C ウイルスに欠失領域があったりまたは関連する標的配列が存在しない増幅プライマーおよびプローブオリゴヌクレオチド（配列番号 1 ～ 3、7）を使用している場合でも発生した。加えて、高力価の J C クローンは、インシリコ分析がいくつかを予測する場合を除いて、B K V オリゴヌクレオチドとの交差反応性を示さなかった（配列番号 4 ～ 5、16 ～ 17）。これは、J C ウイルスサンプルで観察された検出が、実際には J C 核酸配列の増幅ではなく、購入した J C ウイルス DNA の B K V 汚染の検出であることを示してい

50

る。増幅から精製されたアンブリコンの配列決定は、BKゲノムと100%の相同性を示し、さらにJCウイルスサンプルのBKV汚染を示した。BKV ASRの特異性をさらに確認するために、JCウイルスの類似領域をコードするプラスミドクローンを作製した。クローンを、反応あたり 1×10^6 コピーで試験し、BKV増幅プライマーを用いると、増幅は全く観察されなかった。JCプラスミドは推定上のJC特異的プライマーに反応した。

【0222】

実施例5．検出限界記載される増幅プライマーおよびプローブオリゴヌクレオチドを使用して血漿中のBKウイルスの検出限界を決定した。プールされた血漿中のBKウイルスを、PCR製剤との反応性について評価した。培養液中のBKウイルスを、示された濃度で各マトリックスにスパイクした。血漿中のサンプルを、3mg/mLプロテイナーゼK (PK) および $10 \times K18TCO$ を含むPBSで1:0.2に希釈した。

【表61】

表5-1．融合熱サイクリング条件

温度	時間	サイクル
95℃	2:00分	
95℃	0:08分	45
60℃	0:25分	

【表62】

表5-2．PPRミックス

PPRミックス	増幅プライマー配列番号		プローブ オリゴヌクレオチド 配列番号	標的領域
	第1	第2		
1	13	14	15	BK VP2遺伝子

【表63】

表5-3．サンプル.

サンプル	サンプルの説明	濃度 (cp/rxn)	チューブ の数	抽出数	PCR複製 の数 抽出 ごと	最終n PPRごと
BKCF	BKスパイクイン 血漿陰性プール	100、 31.62、 10、3.16	3	2, 3 (1チューブ用)	3	21
陽性対照	STMにおける既製のBK	100	1	1	3	3
陰性対照1	陰性血漿プール+ 希釈液 (BKなし)	該当せず	1	1	3	3
陰性対照2	STM	該当せず	1	1	3	3

総複製物：93

【表 6 4】

表 5－4．設定

チャンネル	クロストーク補正	収束サイクル	サイクル終了 カットオフ	陽性／C Tしきい値
FAM	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
HEX	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
ROX	該当せず	1 0	1 0	5 0 0
RED 6 4 7	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず
RED 6 7 7	該当せず	1 0	該当せず	5 0 0

10

【表 6 5】

表 5－5．BKウイルス培養液．

MFG番号	製造業者	サンプルフォーマット	濃度 (c p /m L)
0 8 1 0 0 6 5 C F	Z e p t o m e t r i x	培養液	1 . 5 7 × 1 0 ¹⁰

【表 6 6】

表 5－6．B k ウイルスの説明

C _i (c p /m L)	C _f (c p /m L)	V _i (μ L)	T E の μ L	V _f (μ L)
1 . 0 0 × 1 0 ⁹	1 . 0 0 × 1 0 ⁸	1 0 . 0	9 0 . 0	1 0 0 . 0 0
1 . 0 0 × 1 0 ⁸	1 . 0 0 × 1 0 ⁷	1 0 . 0	9 0 . 0	1 0 0 . 0 0
1 . 0 0 × 1 0 ⁷	1 . 0 0 × 1 0 ⁶	1 0 . 0	9 0 . 0	1 0 0 . 0 0
1 . 0 0 × 1 0 ⁶	1 . 0 0 × 1 0 ⁵	3 0 . 0	2 7 0 . 0	3 0 0 . 0 0

20

【表 6 7】

表 5－7 B K ウイルスの説明

C _i (c p /m L)	反応管内の C _f (c p / m L)	最終試験 量 (c p / r x n)	試験量の 1 . 2 倍 (希釈液で 1 : 0 . 2 に希釈した場合)	V _i (μ L)	陰性対照の μ L 血漿プール	V _f (μ L)
1 . 0 0 × 1 0 ⁵	3 3 3 3 . 3 3	1 0 0 . 0 0	1 2 0 . 0 0	2 1 7 . 2	6 2 9 8 . 1	6 5 1 5 . 3 3
3 3 3 3 . 3 3	1 0 5 4 . 0 9	3 1 . 6 2	3 7 . 9 5	2 0 1 5 . 3	4 3 5 7 . 7	6 3 7 3 . 0 2
1 0 5 4 . 0 9	3 3 3 . 3 3	1 0 . 0 0	1 2 . 0 0	1 8 7 3 . 0	4 0 5 0 . 0	5 9 2 3 . 0 2
3 3 3 . 3 3	1 0 5 . 4 1	3 . 1 6	3 . 7 9	1 4 2 3 . 0	3 0 7 7 . 0	4 5 0 0 . 0 0
4 2 5 0 μ L のバルクを別のチューブに移す					1 7 7 8 2 . 8	

30

8 5 0 μ L 希釈液を加え、3 0 分間インキュベート

1 5 0 0 μ L を各濃度につき n = 2 1 で、3 本の別々のチューブに移した

40

50

【表 6 8】

表 5－8．オリゴヌクレオチドおよび試薬の濃度．

名称	配列番号	単位	ストック 濃度	最終 濃度	× 1. 2 5	μ L
BKV増幅プライマー	1 3	μ M	1 5 3. 2 8	0. 6 0	0. 7 5	1 6. 8 8
BKV増幅プライマー	1 4	μ M	1 6 5. 5 6	0. 6 0	0. 7 5	1 5. 6 3
BKVプローブオリゴヌクレオチド	1 5	μ M	1 2 6. 0 6	0. 4 0	0. 5 0	1 3. 6 8
I C増幅プライマー	5 3	μ M	1 6 6. 5 0	0. 6 0	0. 7 5	1 5. 5 4
I C増幅プライマー	5 4	μ M	2 3 8. 7 0	0. 6 0	0. 7 5	1 0. 8 4
I Cプローブオリゴヌクレオチド	5 5	μ M	1 1 1. 5 0	0. 4 0	0. 5 0	1 5. 4 7
T r i s、pH8. 0		mM	1 0 0 0. 0 0	4. 0 0	5. 0 0	1 7. 2 5
M g C l ₂		mM	1 0 0 0. 0 0	4. 0 0	5. 0 0	1 7. 2 5
K C I		mM	2 0 0 0. 0 0	6 5. 0 0	8 1. 2 5	1 4 0. 1 6
					水	3 1 8 7. 3 0
					合計：	3 4 5 0. 0 0

10

【表 6 9】

表 5－9．オリゴヌクレオチドの説明

配列番号	配列 5'→3'	修飾	修飾を 含めない MW	修飾を 含めたMW	OD	濃度 (μ M)
1 3	CCCTACTTGAGCCAA RGAAC TAA		6 9 9 3. 5 6	6 9 9 3. 5 6	2 6. 8	1 5 3. 2 8
1 4	GGCCTAACWCCTCAA ACATATGC		6 9 5 7. 0 2	7 0 5 5. 0 2	2 9. 2	1 6 5. 5 6
1 5	TTAAAGCAGCAAACC CAGCAATAGCC	6 1 0, 3' BHQ 2	7 9 2 6. 1 8	9 2 3 3. 3 7	2 9. 1	1 2 6. 0 6

20

30

40

50

【表 7 0】

表5-10. 結果：Ct、RFU、T勾配、および推定バックグラウンドの平均および標準偏差

サンプル名	条件	カウント	陽性	平均 Ct	SD Ct	平均 RFU	SD RFU	平均 TS	SD TS	平均 EB	SD EB	デルタCt 0.5Log	デルタCt 1.0Log
ROX	3.16 cpr	10	48%	39.23	0.52	3017	2297	306	29	1135	103	0.68	2.55
ROX	10 cpr	20	95%	38.54	0.95	4895	1809	293	44	1113	147	1.87	3.75
ROX	31.6 cpr	21	100%	36.68	0.66	7015	1253	302	43	1122	139	1.88	該当せず
ROX	100 cpr	21	100%	34.80	0.39	9007	1237	320	56	1213	156	1.79	該当せず
ROX	BK陽性対照	3	100%	33.01	0.24	10882	988	334	58	1274	126	該当せず	該当せず
ROX	血漿対照	0	0%	該当せず	該当せず	14	8	該当せず	該当せず	1102	39	該当せず	該当せず
ROX	STM対照	0	0%	該当せず	該当せず	13	1	該当せず	該当せず	1195	29	該当せず	該当せず
RED677	3.16 cpr	21	100%	27.81	0.19	9469	1115	311	61	3196	391	該当せず	該当せず
RED677	10 cpr	21	100%	27.84	0.30	9172	1478	303	48	3083	469	該当せず	該当せず
RED677	31.6 cpr	21	100%	27.71	0.45	9242	1341	310	54	3120	430	該当せず	該当せず
RED677	100 cpr	21	100%	27.45	0.26	10140	1653	319	41	3409	595	該当せず	該当せず
RED677	BK陽性対照	3	100%	26.30	0.16	9609	924	354	37	3373	336	該当せず	該当せず
RED677	血漿対照	3	100%	27.41	0.10	8734	483	329	18	3053	161	該当せず	該当せず
RED677	STM対照	3	100%	26.24	0.15	9867	718	375	32	3370	185	該当せず	該当せず

21のPCR複製物のうち20が、血漿中のBKウイルスに対する反応あたり10コピーで検出された。

10

20

30

40

50

【表 7 1】

表5-11. 血漿中のBKV分析感度

コピー／反応	コピー数／ mL	反応性	平均C t	標準偏差 C t	RFUの平均	標準偏差 RFU	平均 バックグラウンド RFU	標準偏差 バックグラウンド RFU	しきい値での 平均勾配	標準偏差 しきい値での 勾配
3.16	87.8	10／21	39.07	0.52	4577.60	831.12	1135.29	103.33	294.70	37.34
10	277.8	20／21	38.38	0.95	5198.30	1463.74	1113.38	147.21	266.40	45.27
31.6	878.4	21／21	36.49	0.67	7085.67	1266.00	1122.05	139.33	289.76	37.07
100	2777.8	21／21	34.61	0.37	9084.38	1242.25	1213.10	156.10	276.38	45.17

10

20

30

40

50

【表 7 2】

表5-12. BKウイルスおよびプラスミドの直線性の結果									
コピー／反応	反応性*	Ct 平均	Ct の標準偏差	平均RFU	RFUの標準偏差	平均バックグラウンドRFU	バックグラウンドRFUの標準偏差	しきい値での平均勾配	しきい値での勾配の標準偏差
培養液中のBKウイルス									
10	6/6	35.64	0.43	12288.44	1511.04	2369.23	179.19	344.44	64.60
100	6/6	31.95	0.39	14362.64	938.16	2173.58	93.73	343.23	60.60
1000	6/6	28.87	0.14	14674.10	859.45	2065.00	107.39	311.44	71.62
10000	6/6	25.26	0.19	14510.42	632.67	1900.22	75.32	330.84	21.43
100000	6/6	21.74	0.07	15671.69	897.05	1904.23	122.63	244.06	6.53
1000000	6/6	18.50	0.11	14378.85	459.21	1786.68	82.24	289.06	18.49
BKプラスミド									
10	6/6	37.10	1.14	9892.52	2010.28	2201.01	238.76	318.25	75.26
100	6/6	33.16	0.22	13049.79	1025.44	2078.22	278.76	317.72	69.69
1000	6/6	29.87	0.09	14400.39	513.24	2025.06	96.88	282.32	64.51
10000	6/6	26.38	0.24	15042.12	1758.95	2085.78	218.49	328.62	47.29
100000	6/6	22.81	0.13	15589.84	1120.75	2060.33	143.53	267.43	56.05
1000000	6/6	19.47	0.06	15254.72	773.24	2015.97	119.87	297.00	13.95

*500 RFUのしきい値を超える増幅曲線として定義される反応性

【0 2 2 3】

結論：結果の評価 BK Vオリゴヌクレオチドは、反応ごとに少なくとも10コピーのBK Vを検出するのに有効であった。血漿中に10コピー／反応（277.8コピー／mL）でスパイクされたBK Vについて95%の検出が観察された。内部対照を両方の研究で100%で検出した

【0 2 2 4】

実施例6. 尿中のBK検出限界BK VP2を使用した尿中のBKウイルスの検出限界増幅プライマーセットを決定した。BKおよびDNA IC検出用のPPRを表6-1に従って調製した。尿中のBKウイルスをPCR製剤との反応性について評価した。培養液

10

20

30

40

50

中のBKウイルスを、示された濃度で各マトリックスにスパイクした。尿中のサンプルを、 3 mg/mL のPKおよび $10\times$ K18 TCOを含有するUTMで1:1に希釈した。すべてのサンプルを、Wave 1配列ファイルを使用して処理した。

【表 7 3】

表 6-1. BK+DNA IC PPR

試薬名	ストック濃度	単位	PRC中の濃度 ($1\times$)	再構成物中の濃度 ($1.25\times$)	量 (μL)
水	該当せず	該当せず		該当せず	3191.3
Tris pH 8	1000	Mm		5	17.3
配列番号13	153.28	μM	0.60	0.75	16.9
配列番号14	165.56	μM	0.60	0.75	15.6
配列番号15	126.06	μM	0.4	0.5	13.7
KCl	2000	mM	65	81.25	140.2
MgCl ₂	1000	mM	4	5	17.3
配列番号53	223.29	μM	0.6	0.75	11.6
配列番号54	238.68	μM	0.6	0.75	10.8
配列番号55	111.54	μM	0.4	0.5	15.5
最終量					3450

3つのPPR管はRecon管に添加した1100 μL を有し、400 μL の油が上部に添加されていた

【0225】

BKウイルス溶解物をスパイクするために、BK陰性の尿プールを作った。尿サンプルIH_1、IH_6、IH_7、IH_8、およびIH_14をそれぞれ3mLプールすることにより、12mLの尿を作製した。次に、さまざまなレベルのBKウイルス溶解物を尿サンプルに添加した。尿中のウイルスの55.6cp/ μL に相当する尿中のウイルスの100、31.62、10、3.16cp/rxnの最終希釈のため、連続希釈を調製した。

【表 7 4】

表 6-2.

開始濃度 (cp/ μL)	最終BK濃度 (cp/ μL)	開始量 (μL)	希釈液の μL	最終量 (μL)	希釈液
1.00×10^6	1.00×10^5	10.0	90.0	100	水
1.00×10^5	1.00×10^4	10.0	90.0	100	水
1.00×10^4	1.00×10^3	20.0	180.0	200	水
1.00×10^3	200	100.0	400.0	500	UTM
1.00×10^3	100	30.0	270.0	300	水
100	5.6	241.7	4108.3	4350	尿プール
5.56	1.76	1344.0	2906.0	4250	尿プール
1.76	0.56	1249.1	2700.9	3950	尿プール
0.556	0.18	948.7	2051.3	3000	尿プール

【0226】

850 μL の最終希釈を、各最終尿中濃度について3倍の850 μL の希釈液を含むサンプルチューブに加えた。300 μL の200cp/rxnを、陽性対照用の希釈液を含む単一のチューブに加えて、3600cp/rxnを得た。UTM+ $10\times$ TCOを最初に各チューブに添加し、次にサンプル（尿またはUTM）を添加した。追加の対照としてBK陽性対照チューブを操作した。

【表 7 5】

表 6 - 3.

サンプル	チューブ の数	$\mu\text{L UTM}$ $+10\times\text{TCO}$	μL BKスパイク 尿または UTM	μL UTM	陰性 尿プール
尿中陰性プールにおけるスパイクされたBK： 100 cp/rxn	3	850	850	0	0
尿陰性プールにおけるスパイクされたBK： 31.62 cp/rxn	3	850	850	0	0
尿中陰性プールにおけるスパイクされたBK： 10 cp/rxn	3	850	850	0	0
尿陰性プールにおいてスパイクされたBK： 3.16 cp/rxn	3	850	850	0	0
陽性対照：UTM中のBK CFで希釈 $\text{UTM } 10\times\text{TCO } 100\text{ cp/rxn}^a$	1	300	300	0	0
陰性対照：UTM：UTM $10\times\text{TCO}$ (希釈液)	1	300	0	300	0
プール画面：尿プール：UTM $10\times\text{TCO}$	1	300	0	0	300

^a 3600 cp/rxn

【0 2 2 7】

サンプルチューブを Panther Fusion システムにロードし、デフォルトの DNA 熱サイクリングプログラムで試験した。サンプルあたりのチューブ、抽出、および複製の数を以下の表に示す。

【表 7 6】

表 6 - 4.

サンプルタイプ	番号 サンプル チューブ	チューブあたりの抽 出数	抽出ごとのP CR複製数	合計 複製物
尿中陰性プールにおけるスパイクされたBK： 100 cp/rxn	3	2, 3 (1チューブ用)	3	21
尿陰性プールにおけるスパイクされたBK： 31.62 cp/rxn	3	2, 3 (1チューブ用)	3	21
尿中陰性プールにおけるスパイクされたBK： 10 cp/rxn	3	2, 3 (1チューブ用)	3	21
尿陰性プールにおいてスパイクされたBK： 3.16 cp/rxn	3	2, 3 (1チューブ用)	3	21
陽性対照：UTM $10\times\text{TCO } 3600\text{ cp/rxn}$ で希釈されたUTM内のBK CF	1	1	3	3
陽性対照：STMのBK CF (希釈液なし、TCOなし) 100 cp/rxn	1	1	3	3
陰性対照：UTM：UTM $10\times\text{TCO}$ (希釈液)。	1	1	3	3
プール画面：尿プール：UTM $10\times\text{TCO}$	1	1	3	3

10

20

30

40

50

【表 7 7】

表 6-5. B K V オリゴヌクレオチド情報.

配列 番号	配列 5'→3'	修飾	OD	濃度 (μ M)
13	CCCTACTTGAGCCAARGAACTAA		26.8	153.28
14	GGCCTAACWCCTCAAACATATGC		29.2	165.56
15	TTAAAGCAGCAAACCCAGCAATAGCC	CalRed610, 3' BHQ2	29.1	126.06

【表 7 8】

表 6-6. DNA I C オリゴヌクレオチド情報。

標的	配列 番号	配列 5'→3'	修飾	OD	濃度 (μ M)
G I C プラスミド	53	ATGGTCAATTAGAGACA AAG		34.6	223.3
G I C プラスミド	54	CGTTCACTATTGGTCTC TGC		36.1	238.7
G I C プラスミド	55	CGGAATCACAAGTCAAT CATCGCGCA	5' Q705 および 3' BHQ2	25.58	111.5

【表 7 9】

表 6-7. T C O 標的

標的	オリゴ名称	配列 5'→3'	修飾	濃度 (mg/mL)
T C O	2' Ome K18_3' Bkd	K18、3T、30A	3'dC (Ac)	2.46

【表 8 0】

表 6-8. UTM での 10×T C O の調製.

ストック T C O 濃度 (mg/mL)	ストック T C O 濃度 (mg/ μ L)	T C O 量 (μ L)	希釈液中の T C O 濃度 (mg/ μ L)	希釈液量 必要 (mg/ μ L)	UTM の μ L
2.46	0.00246	95.0	1.66667×10^{-5}	14025	13930.0

10

20

30

40

50

【表 8 1】

表6ー9. ROXチャネルでのBK検出およびRED677でのID検出										
サンプルID	カウント Ct	陽性	平均 Ct	標準偏差 Ct	平均 T勾配	標準偏差 T勾配	平均 バックグラウンド	標準偏差 バックグラウンド	RFUの 平均 範囲	標準偏差 RFU範囲
陰性UTM	0/3	0%					1239.2	67.5	113.6	9.5
陰性の尿	0/3	0%					1229.0	137.4	105.1	16.2
BK陽性対照 100cpSTM	3/3	100%	32.3	0.2	303.1	39.4	1358.0	131.0	11997.4	992.5
BK3600cp UTM	3/3	100%	27.9	0.1	274.6	77.6	1304.7	64.2	11886.9	457.1
BK100cp 尿	21/21	100%	33.6	0.3	270.5	37.2	1348.5	78.0	11119.2	902.6
BK31.62cp 尿	21/21	100%	35.2	0.5	281.9	44.4	1336.3	113.1	9699.1	1089.5
BK10cp 尿	20/21	95%	37.5	1.0	270.5	44.8	1332.1	101.4	6887.5	2227.5
BK3.16cp 尿	15/21	71%	38.9	0.8	294.2	57.3	1341.7	86.4	3747.9	2568.3

10

20

30

40

50

【表 8 2】

表6-10. RED677チャネルでのIC検出										
サンプルID	カウント Ct	陽性	平均 Ct	標準偏差 Ct	平均 T勾配	標準偏差 T勾配	平均 バックグラウンド	標準偏差 バックグラウンド	RFUの平均 範囲	標準偏差 RFU範囲
陰性UTM	3/3	100%	27.4	0.1	321.4	18.3	1785.0	105.1	5040.5	295.0
陰性の尿	3/3	100%	27.9	0.2	347.8	69.8	1884.9	180.4	5255.3	530.0
BK P05 対照 100cp STM	3/3	100%	26.8	0.4	304.2	21.1	2474.3	610.5	6874.6	1701.3
BK3600cp UTM	3/3	100%	27.3	0.1	349.1	12.5	1933.0	81.5	5328.2	131.3
BK100cp 尿	21/21	100%	27.2	0.1	373.1	26.9	2626.0	111.3	7383.6	314.1
BK31.62cp尿	21/21	100%	27.5	0.3	310.4	60.8	2357.3	460.0	6657.4	1252.0
BK10cp 尿	21/21	100%	27.7	0.3	292.7	56.4	2211.8	327.1	6193.9	892.4
BK3.16cp 尿	21/21	100%	27.4	0.1	343.0	24.7	2550.9	147.2	6903.2	443.3

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

【表 8 3】

表6-11. 尿中のBKV分析感度										
コピー／反応	コピー数／ mL	反応性	平均C t	標準偏差 C t	RFUの平均	標準偏差 RFU	平均 バックグラウン dRFU	標準偏差 バックグラウン dRFU	しきい値での 平均勾配	標準偏差 しきい値での 勾配
3.16	87.8	15/21	39.04	0.86	5174.60	1121.40	1341.67	86.49	332.93	39.01
10	277.8	20/21	37.72	1.03	7143.10	1624.81	1332.10	101.46	320.25	43.50
31.6	878.4	21/21	35.48	0.53	9603.62	1085.44	1336.33	113.20	319.14	54.08
100	2777.8	21/21	33.86	0.27	11012.05	900.68	1348.43	77.90	307.86	55.27

【表 8 4】

表 6-12. 10 c p / r x n で 95 % の B K 検出を観察した。

サンプル I D	C t 数	陽性	平均 C t
陰性 UTM	0 / 3	0 %	
陰性の尿	0 / 3	0 %	
BK 陽性対照 100 c p STM	3 / 3	100 %	32.3
BK 3600 c p UTM	3 / 3	100 %	27.9
BK 100 c p 尿	21 / 21	100 %	33.6
BK 31.62 c p 尿	21 / 21	100 %	35.2
BK 10 c p 尿	20 / 21	95 %	37.5
BK 3.16 c p 尿	15 / 21	71 %	38.9

10

【0228】

結論：BKV オリゴヌクレオチドは、95 % の陽性率で、1 反応あたり尿中の少なくとも 10 コピーの BVK (277.8 コピー / mL) を検出するのに有効であった。内部対照を、両方の研究において 100 % で検出した。

【0229】

上記または下記に引用されたすべての特許出願、ウェブサイト、他の刊行物、アクセッション番号は、個々の項目が参照によりそのように組み込まれることが具体的かつ個別に示された場合と同じ程度に、すべての目的のためにその全体が参照により組み込まれる。配列の異なるバージョンが異なる時間のアクセッション番号に関連付けられている場合、この出願の有効な出願日のアクセッション番号に関連付けられているバージョンを意味する。有効な出願日とは、該当する場合はアクセッション番号を参照して、優先出願の実際の出願日または出願日のいずれか早い方を意味する。同様に、出版物、ウェブサイトなどの異なるバージョンが異なる時間に公開される場合、別段の指示がない限り、有効な出願日に最後に公開されたバージョンを意味する。本発明の任意の特徴、工程、要素、実施形態、または態様は、別段の具体的な指示がない限り、他のものと組み合わせて使用することができる。

20

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

30

(項目 1)

BK ポリオーマウイルス (BKV) 核酸配列を増幅するための増幅プライマーであって、

a) 1 つまたは複数の第 1 の増幅プライマーであって、各第 1 の増幅プライマーが、長さが 18 ~ 30 ヌクレオベースであり、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 10、配列番号 13、配列番号 16、配列番号 21、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 46、および配列番号 47 からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 90 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、第 1 の増幅プライマーと、

b) 1 つまたは複数の第 2 の増幅プライマーであって、各第 2 の増幅プライマーが、長さが 19 ~ 30 個のヌクレオベースであり、配列番号 2、配列番号 5、配列番号 9、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 22、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 48、および配列番号 49 からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 90 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、第 2 の増幅プライマーと、を含む、増幅プライマー。

40

(項目 2)

前記第 1 の増幅プライマーおよび / または前記第 2 の増幅プライマーが、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドを含む、項目 1 に記載の増幅プライマー。

(項目 3)

50

前記修飾ヌクレオチドが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、または5'-メチル-2'-デオキシシトシンを含む、項目1または2に記載の増幅プライマー。

(項目4)

3'末端シトシンが存在する場合を除いて、前記第1の増幅プライマーおよび／または前記第2の増幅プライマー中のすべてのシトシンが5'-メチル-2'-デオキシシトシンである、項目3に記載の増幅プライマー。

(項目5)

a) 1つまたは複数の第1の増幅プライマーのそれぞれのヌクレオチド配列が、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10、配列番号13、配列番号16、配列番号21、配列番号24、配列番号25、配列番号30、配列番号31、配列番号34、配列番号35、配列番号38、配列番号39、配列番号42、配列番号43、配列番号46、および配列番号47からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなり、

10

b) 1つまたは複数の第2の増幅プライマーのそれぞれのヌクレオチド配列が、配列番号2、配列番号5、配列番号9、配列番号12、配列番号14、配列番号18、配列番号19、配列番号22、配列番号26、配列番号28、配列番号29、配列番号32、配列番号33、配列番号36、配列番号37、配列番号40、配列番号41、配列番号44、配列番号45、配列番号48、および配列番号49からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなる、項目1～4のいずれか一項に記載の増幅プライマー。

(項目6)

20

a) 第1の増幅プライマーが、配列番号1のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号2のヌクレオチド配列を含む、

b) 第1の増幅プライマーが、配列番号4のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号5のヌクレオチド配列を含む、

c) 第1の増幅プライマーが、配列番号7のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号9のヌクレオチド配列を含む、

d) 第1の増幅プライマーが、配列番号10のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号12のヌクレオチド配列を含む、

e) 第1の増幅プライマーが、配列番号13のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号14のヌクレオチド配列を含む、

30

f) 第1の増幅プライマーが、配列番号16のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号18のヌクレオチド配列を含む、

g) 第1の増幅プライマーが、配列番号21のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号19のヌクレオチド配列を含む、

h) 第1の増幅プライマーが、配列番号24のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号22のヌクレオチド配列を含む、または

i) 第1の増幅プライマーが、配列番号25のヌクレオチド配列を含み、第2の増幅プライマーが、配列番号26のヌクレオチド配列を含む、項目1～5のいずれか一項に記載の増幅プライマー。

(項目7)

40

a) 前記第1の増幅プライマーが、配列番号13のヌクレオチド配列を含み、前記1つまたは複数の第2の増幅プライマーが、配列番号36のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、配列番号37のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、を含む、

b) 前記1つまたは複数の第1の増幅プライマーが、配列番号35のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、配列番号36のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、を含み、前記第2の増幅プライマーが、配列番号14のヌクレオチド配列を含む、

c) 前記1つまたは複数の第1の増幅プライマーが、配列番号35のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、配列番号36のヌクレオチド配列を含む少な

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

n) 前記1つまたは複数の第1の増幅プライマーが、配列番号46のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、配列番号47のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、を含み、前記1つまたは複数の第2の増幅プライマーが、配列番号44のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、配列番号45のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、を含む、または

o) 前記第1の増幅プライマーが、配列番号25のヌクレオチド配列を含み、前記1つまたは複数の第2の増幅プライマーが、配列番号48のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、配列番号49のヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの増幅プライマーと、を含む、項目1～6のいずれか一項に記載の増幅プライマー。

(項目8)

長さが21～30ヌクレオベースのオリゴヌクレオチドを含み、配列番号3、配列番号6、配列番号8、配列番号11、配列番号15、配列番号17、配列番号20、配列番号23、および配列番号27からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、前記プローブオリゴヌクレオチドが少なくとも1つの検出可能な標識に結合されている、増幅されたBKV核酸配列を検出するためのプローブオリゴヌクレオチド。

10

(項目9)

前記プローブオリゴヌクレオチドが少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む、項目8に記載のプローブオリゴヌクレオチド。

(項目10)

前記修飾ヌクレオチドが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、または5'-メチル-2'-デオキシシトシンを含む、項目9に記載のプローブオリゴヌクレオチド。

(項目11)

前記プローブオリゴヌクレオチドが、2、3、4、5、6、7または8個の5'-メチル-2'-デオキシシトシンを含む、項目10に記載のプローブオリゴヌクレオチド。

20

(項目12)

前記プローブオリゴヌクレオチド中のすべてのシトシンが、5'-メチル-2'-デオキシシトシンである、項目11に記載のプローブオリゴヌクレオチド。

(項目13)

前記プローブオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列が、配列番号3、配列番号6、配列番号8、配列番号11、配列番号15、配列番号17、配列番号20、配列番号23、および配列番号27からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなる、項目8～12のいずれか一項に記載のプローブオリゴヌクレオチド。

(項目14)

前記検出可能な標識が、プローブオリゴヌクレオチドの5'または3'末端に結合した蛍光分子を含む、項目8～13のいずれか一項に記載のプローブオリゴヌクレオチド。

30

(項目15)

前記蛍光分子がプローブオリゴヌクレオチドの5'末端に結合し、クエンチャーが前記プローブオリゴヌクレオチドの3'末端に結合している、項目14に記載のプローブオリゴヌクレオチド。

(項目16)

前記プローブオリゴヌクレオチドが加水分解プローブである、項目14または15に記載のプローブオリゴヌクレオチド。

(項目17)

項目1～7のいずれか一項に記載の増幅プライマーおよび／または項目8～16のいずれか一項に記載のプローブオリゴヌクレオチドを備える、BKV核酸配列を増幅するためのキット。

40

(項目18)

前記増幅プライマーおよび前記プローブオリゴヌクレオチドが単一の容器または別個の容器で提供される、項目17に記載のキット。

(項目19)

前記少なくとも1つの反応混合物が、1つまたは複数のDNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、陽性コントロール核酸、陰性コントロール核酸、内部コントロール核酸、コントロール増幅プライマー、コントロールプローブオリゴヌク

50

レオチド、K C l、M g C l₂、酢酸カリウム、緩衝液、B S A、スクロース、トレハロース、D M S O、ベタイン、ホルムアミド、グリセロール、ポリエチレングリコール、非イオン性洗剤、アンモニウムイオン、およびE D T Aを含む、少なくとも1つの反応混合物をさらに含む、項目17または18に記載のキット。

(項目20)

使用説明書をさらに備える、項目17～19のいずれか一項に記載のキット。

(項目21)

B K V核酸配列を含むまたは含むと疑われるサンプルを項目1～7のいずれか一項に記載の増幅プライマーと接触させることと、核酸増幅反応を実施することと、を含む、B K V核酸配列を増幅する方法。

(項目22)

核酸増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応(P C R)を含む、項目21に記載の方法。

(項目23)

B K V核酸配列を含む、または含むことが疑われるサンプルまたは増幅産物を、項目8～16のいずれか一項に記載のプローブオリゴヌクレオチドと接触させることと、プローブオリゴヌクレオチドからのシグナルを検出することと、を含む、B K V核酸配列を検出する方法。

(項目24)

B K Vを検出する方法であって、B K Vを含むまたは含むことが疑われるサンプルを、項目1～7のいずれか一項に記載の増幅オリゴヌクレオチドおよび項目8～16のいずれか一項に記載のプローブオリゴヌクレオチドと接触することと、核酸増幅反応を実施することと、前記プローブオリゴヌクレオチドからのシグナルを検出することと、を含み、前記検出することがB K Vの存在または不在を決定する、B K Vを検出する方法。

(項目25)

前記プローブオリゴヌクレオチドからのシグナルを検出することが、前記シグナルを定量化することを含む、項目24に記載の方法。

(項目26)

前記検出することがリアルタイムで分析される、項目24に記載の方法。

【配列表】

0007542546000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92010, カールスバッド, ロバートソン ロード 4812

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 特表2011-512160 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

- C12Q 1/6888
- C12Q 1/6851
- C12Q 1/6853
- C12Q 1/686
- C12Q 1/70
- CAplus/REGISTRY (STN)