

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4913042号

(P4913042)

(45) 発行日 平成24年4月11日 (2012. 4. 11)

(24) 登録日 平成24年1月27日 (2012. 1. 27)

|                                 |                       |
|---------------------------------|-----------------------|
| (51) Int. Cl.                   | F I                   |
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006. 01)</b> | C 1 2 N 15/00 Z N A A |
| <b>C 1 2 Q 1/70 (2006. 01)</b>  | C 1 2 Q 1/70          |
| <b>C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)</b>  | C 1 2 Q 1/68 A        |

請求項の数 31 (全 58 頁)

|               |                               |           |                                     |
|---------------|-------------------------------|-----------|-------------------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2007-513883 (P2007-513883)  | (73) 特許権者 | 506215582                           |
| (86) (22) 出願日 | 平成17年6月3日 (2005. 6. 3)        |           | バイオーラッド・イノベーションズ                    |
| (65) 公表番号     | 特表2008-501328 (P2008-501328A) |           | B I O - R A D I N N O V A T I O N S |
| (43) 公表日      | 平成20年1月24日 (2008. 1. 24)      |           | フランス国、エフ-92430 マルヌー                 |
| (86) 国際出願番号   | PCT/EP2005/006513             |           | ラーコケット、ブルヴァール・レイモン                  |
| (87) 国際公開番号   | W02005/118883                 |           | ・ポアンカレ 3                            |
| (87) 国際公開日    | 平成17年12月15日 (2005. 12. 15)    | (74) 代理人  | 100078662                           |
| 審査請求日         | 平成20年5月22日 (2008. 5. 22)      |           | 弁理士 津国 肇                            |
| (31) 優先権主張番号  | 04291402.8                    | (74) 代理人  | 100113653                           |
| (32) 優先日      | 平成16年6月4日 (2004. 6. 4)        |           | 弁理士 東田 幸四郎                          |
| (33) 優先権主張国   | 欧州特許庁 (EP)                    | (74) 代理人  | 100116919                           |
|               |                               |           | 弁理士 齋藤 房幸                           |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H I V タイプおよびサブタイプの検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも一つの H I V 標的を検出する方法であって、

少なくとも2つのオリゴヌクレオチドによって、少なくとも一つの単位複製配列であるポリヌクレオチドを生成するステップを含み、

該オリゴヌクレオチドは、

ー 配列番号2、および配列番号306、配列番号307、配列番号308から選択される配列番号2のフラグメント；

ー 配列番号4、および配列番号310、配列番号311から選択される配列番号4のフラグメント；

ー 配列番号5；

ー 配列番号1、および配列番号305；ならびに

ー 配列番号3、および配列番号309；

からなる群から選択される少なくとも一つの基準鋳型配列の特異的な増幅のために構造的に適当なプライマーであり、

ここで、該プライマーは、K 0 3 4 5 5 H I V 1 - M 基準分離体、L 2 0 5 8 7 H I V 1 - O 基準分離体、又は該基準鋳型配列からなる該 H I V 基準分離体配列を標的にする位置での K 0 3 4 5 5 H I V 1 - M 基準分離体へのアニーリングのために構造的に適当である、方法。

【請求項 2】

さらに、少なくとも一つのプローブによって該単位複製配列であるポリヌクレオチドを検出することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該方法が、配列番号 91、100、109、127、136、190～194、297～303 からなる群より選択される少なくとも一つのプローブを用いて行われる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記方法が、

－ 配列番号 9、12、14、15、24、52、82 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー

10

を用いて実施される、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記方法が、

－ 配列番号 9、12、14、15 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー；および

－ 配列番号 24、52、82 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー

を用いて実施される、請求項 1～4 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

前記方法が、

－ 配列番号 148、157、167、170、179、189 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー

20

を用いて実施される、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記方法が、

－ 配列番号 148、157、167 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー；および

－ 配列番号 170、179、189 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー；

を用いて実施される、請求項 1～6 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

30

前記方法が、

－ 配列番号 221、249、276、287、296 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー

を用いて実施される、請求項 1～7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記方法が、

－ 配列番号 221、249 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー；および

－ 配列番号 276、287、296 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー；

40

を用いて実施される、請求項 1～8 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

前記方法が、

－ 配列番号 6、24、52、82 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマーを用いて実施される、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記方法が、

－ 配列番号 6 である選択した少なくとも一つのプライマー；および

－ 配列番号 24、52、82 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー；

を用いて実施される、請求項 1～10 のいずれか一項記載の方法。

50

## 【請求項 12】

前記方法が、

- － 配列番号 139、170、179、189 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー

を用いて実施される、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記方法が、

- － 配列番号 139 である少なくとも一つのプライマー；および
- － 配列番号 170、179、189 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー；

を用いて実施される、請求項 1～12 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 14】

少なくとも一つの単位複製配列であるポリヌクレオチドを生成する前記ステップが、少なくとも一つの定量および／または定性的、マルチプレックスおよび／または単一 PCR 増幅を含む、請求項 1～13 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 15】

HIV 含有試料に対して請求項 1～14 のいずれか一項記載の方法を実施することによって得られる単位複製配列であるポリヌクレオチド。

## 【請求項 16】

請求項 15 に記載の少なくとも一つの単位複製配列であるポリヌクレオチドを含む増幅組成物。

## 【請求項 17】

- － 配列番号 2；および配列番号 306、配列番号 307、配列番号 308 から選択される配列番号 2 のフラグメント；
  - － 配列番号 4；および配列番号 310、配列番号 311 から選択される配列番号 4 のフラグメント；
  - － 配列番号 5；
  - － 配列番号 1、配列番号 305；ならびに
  - － 配列番号 3、および配列番号 309
- からなる群から選択される、ポリヌクレオチド。

## 【請求項 18】

HIV の検出に適切なオリゴヌクレオチドのセットであって、

- － 配列番号 6、9、12、14、15 からなる群；
- － 配列番号 24、52、82 からなる群；

中の異なる 2 群から選択される少なくとも 2 つのオリゴヌクレオチドを含む、オリゴヌクレオチドのセット。

## 【請求項 19】

さらに、配列番号 91、100、109、118、127、136 からなる群より選択される少なくとも一つのオリゴヌクレオチドを含む、請求項 18 に記載のセット。

## 【請求項 20】

HIV の検出に適切なオリゴヌクレオチドのセットであって、

- － 配列番号 139、148、157、167 からなる群
- － 配列番号 170、179、189 からなる群

の二つの異なる群から選択した少なくとも二つのオリゴヌクレオチドを含む、オリゴヌクレオチドのセット。

## 【請求項 21】

さらに、配列番号 190～194 からなる群より選択される少なくとも一つのオリゴヌクレオチドを含む、請求項 20 に記載のセット。

## 【請求項 22】

HIV の検出に適切なオリゴヌクレオチドのセットであって、

10

20

30

40

50

- ー 配列番号 2 2 1、2 4 9 からなる群
- ー 配列番号 2 7 6、2 8 7、2 9 6 からなる群

の二つの異なる群から選択した少なくとも二つのオリゴヌクレオチドを含む、オリゴヌクレオチドのセット。

【請求項 2 3】

さらに、配列番号 2 9 7～2 9 9 からなる群より選択される少なくとも一つのオリゴヌクレオチドを含む、請求項 2 2 に記載のセット。

【請求項 2 4】

H I V の検出に適当なオリゴヌクレオチドのセットであって、

- ー 配列番号 2 2 1、2 4 9 からなる群
- ー 配列番号 2 7 6、2 8 7、2 9 6 からなる群

の二つの異なる群から選択した少なくとも二つのオリゴヌクレオチドを含む、オリゴヌクレオチドのセット。

【請求項 2 5】

さらに、配列番号 3 0 0～3 0 3 からなる群より選択される少なくとも一つのオリゴヌクレオチドを含む、請求項 2 4 に記載のセット。

【請求項 2 6】

H I V の検出に適当なオリゴヌクレオチドのセットであって、

- ー 配列番号 9 1、1 0 0、1 0 9、1 1 8、1 2 7、1 3 6 からなる群
- ー 配列番号 1 9 0～1 9 4 からなる群
- ー 配列番号 2 9 7～2 9 9 からなる群
- ー 配列番号 3 0 0～3 0 3 からなる群

の二つの異なる群から選択した少なくとも二つのオリゴヌクレオチドを含む、オリゴヌクレオチドのセット。

【請求項 2 7】

前記オリゴヌクレオチドの少なくとも一つが蛍光標識されている、請求項 1 8～2 6 のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチドのセット。

【請求項 2 8】

- ー 配列番号 9、1 2、1 4、もしくは 1 5 のプライマーと、配列番号 2 4、5 2、もしくは 8 2 のプライマー；または
- ー 配列番号 1 4 8、1 5 7、もしくは 1 6 7 のプライマーと、配列番号 1 7 0、1 7 9、もしくは 1 8 9 のプライマー；または
- ー 配列番号 2 2 1 もしくは 2 4 9 のプライマーと、配列番号 2 7 6、2 8 7、もしくは 2 9 6 のプライマー；または
- ー 配列番号 6 のプライマーと、配列番号 2 4、5 2、もしくは 8 2 のプライマー；または
- ー 配列番号 1 3 9 のプライマーと、配列番号 1 7 0、1 7 9、もしくは 1 8 9 のプライマー；

から選択した一对のプライマーを用いて H I V 含有試料から増幅によって得られる単位複製配列であるポリヌクレオチド。

【請求項 2 9】

請求項 1 7 に記載のポリヌクレオチドのヌクレオチド長とヌクレオチド長が同一であり、プローブ配列とのヌクレオチド同一率がこのプローブ配列の全長にわたって少なくとも 9 0 % である配列を含み、ここで、このプローブ配列が以下：配列番号 9 1、1 0 0、1 0 9、1 1 8、1 2 7、1 3 6、1 9 0、1 9 1、1 9 2、1 9 3、1 9 4、2 9 7、2 9 8、2 9 9、3 0 0、3 0 1、3 0 2、3 0 3、または、これらのプローブ配列番号の配列の一つに、このプローブ配列番号の配列の全長にわたって相補的な配列の一つである、単位複製配列であるポリヌクレオチド。

【請求項 3 0】

請求項 2 8 または 2 9 に記載した単位複製配列であるポリヌクレオチドを含む増幅組成

10

20

30

40

50

物。

【請求項 31】

請求項 18～26 のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチドの少なくとも一つのセットを含む HIV 診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、HIV および HIV サブタイプの分野に関する。より正確には、本発明は、HIV タイプおよびサブタイプの検出、特に、HIV タイプおよびサブタイプのマルチプレックス検出に関する。

10

【背景技術】

【0002】

HIV（ヒト免疫不全ウイルス）は、後天性免疫不全症候群（AIDS）の原因であり、ヒトレトロウイルス科に属するウイルスである。現在、AIDS は、ヒトの健康に対して最も大きな脅威の一つとみなされている。HIV 感染個体は、何年も無症候でいながら疾患を伝達せうる。

【0003】

推測される AIDS を担う病原体は、1983～1984 年に幾つかの研究グループ（例えば、Barre-Sinoussi ら、Science 220:868-871；Montagnier ら、Human T-Cell Leukemia Viruses (Gallo, Essex & Gross 編)；Vilmer ら、The Lancet 1:753 を参照）によって別個に同定され、続いて HIV の名称に統一された。

20

【0004】

HIV 科には、数種のタイプおよびサブタイプが含まれる。HIV1 ウイルスは、サブタイプによって分類することができる。HIV1 サブタイプの例には、HIV1-M および HIV1-O が含まれる。同様に、HIV2 ウイルスには、様々なサブタイプ、例えば HIV2-A や HIV2-B が含まれる。

【0005】

薬物開発アッセイ、予防法、および AIDS 治療に向けて、現在、所与の試料中に存在する HIV ウイルスのグループ、タイプ、およびサブタイプを迅速容易に同定し数量化できることが非常に重要になってきた。

30

【0006】

本明細書において本発明者らは、HIV グループとは、それが優先権主張日に公知であるか否かに関わりなく、任意の HIV グループであると解釈する。様々な HIV グループが当技術分野で公知であり、その対応する文献およびデータベース、例えば、インターネット上の ncbi に記載されている。その例には HIV1-M や HIV1-O が含まれる。

【0007】

本明細書において本発明者らは、HIV サブタイプとは、それが優先権主張日に公知であるか否かに関わりなく、任意の HIV サブタイプであると解釈する。様々な HIV サブタイプが、当技術分野で公知であり、その対応する文献およびデータベース、例えば、インターネット上の ncbi に記載されている。

40

【0008】

HIV 分離体とは、それが優先権主張日に公知であるか否かに関わりなく、本発明者らは本明細書において任意の HIV 分離体または株であると解釈する。様々な HIV 分離体が、当技術分野で公知であり、その対応する文献およびデータベース、例えば、インターネット上の ncbi に記載されている。幾つかの分離体は基準とみなされる。その例には K03455、L20587、および M30502 が含まれる。

【0009】

可能な手法は、特異的抗体の開発に依存していた。しかし、感受性および特異性の点から、通常、PCR を基にした手法が非常に有望に思われる。また、一般的に、この手法に

50

よって小さな試料について研究できるようなる。

【0010】

増幅法、特に、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびPCRに基づく方法、例えば、逆転写酵素PCR（RT-PCR）およびPCRが当技術分野では公知である（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis, Fritsch, およびSambrook, CSHL Press; Molecular Biology of the Cell, Albertsら; PCR Primer: A Laboratory Manual, Dieffenbach および Dveksler, CSHL Press; The Polymerase Chain Reaction, Mullis, Ferre, および Gibbs, Birkhauser Boston Press; Gene quantification, Ferre, Birkhauser Boston Press.）

【0011】

こうした方法は、一般に、複合的な生物試料の定性および定量分析に非常に有効なツールである。

【0012】

しかし、これらの技術の有効性は、典型的および決定的にプライマーの設計および選択に依存している。

【0013】

HIV1 特異的プライマーについて記述する従来技術がある（米国特許第5712385号、欧州特許第1043407号、国際公開公報第03/020878号、欧州特許第1344837号）。HIV2 特異的プライマーについて記述する従来技術もある（米国特許第5962665号）。

【0014】

作業条件に応じて、これらの従来技術のプライマーの少なくとも幾つかは、十分なHIV1またはHIV2 特異性を示すことができ、それによってHIV1およびHIV2 を特異的に検出できるようにする。しかし、本出願人の知るところでは、これらのプライマーのどれによっても

— 前記サブタイプをリアルタイムで定量的特異的に検出すること、または  
— 特異性を残したまま該サブタイプをマルチプレックス（multiplex）で検出すること、または  
— リアルタイムで実行した場合でさえも、定量的でありながら該サブタイプをマルチプレックスで検出することは可能ではない。

【0015】

しかし、そのようにリアルタイムで定量的マルチプレックス特異的に検出することは、患者の実際の感染段階に対し、より確実かつ有益なはずである。従って、より正確な診断が利用可能になり、その結果、所与の処置の有害な作用に対して、より正確に正のバ実施スが取れるようになるはずである。それによって、診断する特定の患者に対し最も有効となる処置を調整し、または選択できるようになるであろう。

【0016】

そのようなリアルタイムでの定量的マルチプレックス特異的検出は、特に大規模な場合、実施にはより迅速、より容易であるという利点もある。

【0017】

発明の詳細な説明

本発明は、HIVを検出するための方法を提供する。

【0018】

本発明は、HIVの検出に適しているプライマーとプローブ、およびそのセットを含むオリゴヌクレオチドを提供する。

【0019】

この点で、本発明は、増幅、PCRおよびPCRを基にした方法、ならびに診断の分野にも関する。

【0020】

本明細書において本発明者らは、PCRまたはPCR反応とは任意のPCRを基にした方法であると解釈する。この方法には、標準的PCR、定性、定量、および半定量PCR、リアルタイムPCR、逆転写酵素PCR（RT-PCR）、単一およびマルチプレックスPCRなどが含まれる。

#### 【0021】

本明細書において本発明者らは、リアルタイムPCRとは、慣用のPCR法によるエンドポイント検出とは対照的に、各PCRサイクル中に、単位複製配列の生成の指標として反応中に発せられる蛍光をモニタリングできるようにする、任意のPCRを基にした方法であると解釈する。

#### 【0022】

本明細書において本発明者らは、定量PCRとは、所与の試料中の所与のPCR標的の初期量を予測できるようにする任意のPCRを基にした方法であると解釈する。

#### 【0023】

本明細書において本発明者らは、マルチプレックスPCRとは、一つを超える標的の増幅を目的とする任意のPCR反応、例えば、二重PCR（2つの標的）、三重PCR（3つの標的）、より多いマルチプレックスPCRを含むマルチプレックスPCRであると解釈する。マルチプレックスPCRには、一つを超えるプライマー対、例えば、2つのプライマー対を用いたPCR反応が含まれる。その場合、異なる4つのプライマーであってもよいが、2つのプライマー対に、共通する一つのプライマー、例えば、フォワードプライマーを持たせることも、2つの異なるリバースプライマーを持たせることも可能である。マルチプレックスPCRには、特有のプライマー対を用いるが、一つを超えるプローブを用いるPCR反応も含まれる。

#### 【0024】

本明細書において本発明者らは、オリゴヌクレオチドとは、任意の短いヌクレオチドポリマーであると解釈し、ここで、ヌクレオチドはリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、縮重ヌクレオチドなどでありうる。前記オリゴヌクレオチドは、一本鎖であることが好ましい。前記オリゴヌクレオチドの長さは、様々であってよく、通常、150ヌクレオチド（nt）未満、好ましくは10～100nt、より好ましくは15～60nt、さらにいっそう好ましくは18～50ntの範囲であってよい。前記オリゴヌクレオチドは、タギング（tagging）やマーキングなどの化学的修飾を受けていてよく、例えば、放射性、蛍光、ビオチン化、DIG標識されていてよい。本発明によるオリゴヌクレオチドは、フォワード（センス）またはリバース（アンチセンス）であってよい。さらに、本発明による幾つかのオリゴヌクレオチドに関係付けて好ましい機能を述べることもできるが、所与のオリゴヌクレオチドは数種の機能を有し、本発明による異なる方法で使用できることは明白であるということを強調すべきである。例えば、オリゴヌクレオチドは、プライマーまたはプローブとして使用することができる。また、オリゴヌクレオチドが単位複製配列を標的とするプローブとして有用であると記載される場合、当業者は、このオリゴヌクレオチドの相補配列が同じ単位複製配列を標的にするためのプローブとして等しく有用であると解釈するものとする。また、マルチプレックスアッセイに適さないずれのプライマーも、本発明の意味において、一重プロトコルで使用できることは明白である。同じことは、リアルタイムプロトコルに適当なプライマーについても当てはまり、このプライマーも本発明の意味におけるエンドポイントアッセイのフレームワーク内で使用することができる。

#### 【0025】

本発明によるオリゴヌクレオチドには、特に、PCRプライマーおよびプローブが含まれる。特に明記しない限り、核酸配列は5'から3'方向に向けて示される。前記オリゴヌクレオチドは、多くの形態にすることができ、例えば、乾燥状態、所望の溶媒および所望の濃度による溶液／懸濁液にすることもできる。どの溶媒、濃度、保存条件が本発明のオリゴヌクレオチドに適しているかについては、当業者は承知しているものとする。特に、当業者は、保存液として前記オリゴヌクレオチドを調製するための方法を承知している

10

20

30

40

50

ものとする。本発明によるオリゴヌクレオチドは、当業者が、例えば、HPLCクロマトグラフィーによって判断できるような様々な純度であってもよい。

【0026】

本明細書において本発明者らは、オリゴヌクレオチドのセットとは、少なくとも一つのオリゴヌクレオチド、好ましくは少なくとも2つ、例えば、2～10のオリゴヌクレオチドを含む任意の組合せであると解釈する。従って、前記セットは、一つのPCRプライマー、または一対のPCRプライマー、または一つのプローブ、または一つのプローブと一対のプライマーを含むことができる。前記オリゴヌクレオチドは、別々にしておくことも、または部分的に混合し、または完全に混合することもできる。

【0027】

プライマーまたはPCRプライマーの概念は当業者には公知である。例えば、その概念には、適当なストリンジェンシー条件下で標的鋳型にアニールすることができ、ポリメラーゼ鎖を伸張することが可能な任意のオリゴヌクレオチドが含まれる。前記プライマーの典型的な長さは、15～30 ntであり、18、19、20、21、22、23、24または25 ntが好ましい。

【0028】

プローブの概念も当業者には公知である。例えば、その概念には、所望のハイブリッド形成条件下で標的鋳型にアニールできる任意のオリゴヌクレオチドが含まれる。前記プローブの典型的な長さは20～55 ntであり、15～60 ntが好ましく、20～55 ntがより好ましく、30～50 ntがより好ましく、35～45 ntがさらに好ましい。該プローブは蛍光標識されているのが好ましい。しかし、ある条件下ではプライマーをプローブとして使用することができ、逆も同様であることは当業者には明白である。さらに、本発明による生成物、特にその中でもオリゴヌクレオチドは、本明細書で述べた所定の使用だけには限らず、示唆した目的に関わらず、むしろ広く解釈されることを本明細書において強調する。例えば、特定の用途のための生成物（オリゴヌクレオチド）に対する請求は、示した使用に実際に適当な生成物（オリゴヌクレオチド）を意味するものとして解釈すべきである。従って、マルチプレックスプロトコルにおいてプライマーとして使用するのに適当なオリゴヌクレオチドはまた、本発明の意味における単一プロトコルに明瞭に適応する。

【0029】

Taqman（登録商標）プローブ（加水分解プローブ）、molecular beacons（登録商標）（ビーコンプローブまたは分子ビーコンプローブ）、およびScorpion（登録商標）プローブを含む様々な型式（型）のプローブが当技術分野で公知である。

【0030】

好ましい態様では、本発明によるプローブは全て、分子ビーコン型式で合成し使用することができる。

【0031】

分子ビーコンの構造は以下の通りである。すなわち、標的配列に無関係な短いヌクレオチド配列（いわゆるビーコンアーム）はプローブ両端に共有結合している。従って、短い無関係のアームはプローブの5'に結合し、そして蛍光部分（すなわち、蛍光色素または蛍光マーカー）によって標識される。別の、しかし同様に無関係のアームは、プローブの3'末端に結合し、蛍光消光部分によって標識される。従って、分子ビーコンは、フルオロフォアとクエンチャーを両端に有する。5'の短いアームは、3'のそれに完全に相補的であり、その結果、それらは一緒にアニールされ、それによって、溶液中の標的にハイブリッド形成されない場合はヘアピン構造を有しうる。このヘアピン高次構造において、クエンチャーおよび蛍光色素は、フルオロフォアを効率的に消光するのに十分なほど互いに近接している。しかし、プローブが標的分子に遭遇した場合、ビーコンアームT<sub>m</sub>およびプローブT<sub>m</sub>の値が適切に選択されると、アニーリングはヘアピン高次構造に対して優勢になる（理論上：プローブT<sub>m</sub>>ビーコンアームT<sub>m</sub>>プライマーT<sub>m</sub>、T<sub>m</sub>=対象の融解温度）。フルオロフォアおよびクエンチャーは、互いから遠ざかり、次いでフルオロ

フォアは適当な光励起により照射されると蛍光発光しうる。PCRが進行するにつれ、増幅生成物は蓄積し、任意の所与のサイクルでの蛍光量は、その時に存在する増幅生成物の量に依存する。（参照、例えば、Sanjay TyagiおよびFred Russell Kramer、Nature Biotechnology 1996, volume 14, pages 303-308 ; Nature Biotechnology 1998, volume 16, pages 49-53）。

#### 【0032】

（注：フルオロフォアを3'末端に結合させ、クエンチャーを5'末端に結合させることもできる）

#### 【0033】

概略的に、前記プローブを次式（分子ビーコン型式）

5'フルオロフォアー（アーム1）－プローブー（アーム2）－クエンチャー3'

5'クエンチャーー（アーム1）－プローブー（アーム2）－フルオロフォア3'

で示すことができる、

ここで、アーム1およびアーム2は、適当なストリンジェンシー条件下でヘアピン構造を形成するような、例えば、3～10nt、好ましくは5、6、7nt範囲の任意の短いヌクレオチド配列であってよく、すなわち、アーム1およびアーム2は所望のストリンジェンシー条件下でアニールするのに完全に相補的である（標準的PCRストリンジェンシー条件には、例えば、アニーリング温度55～65℃およびMg濃度4～8mMが含まれる）。しかし、アーム1およびアーム2は、プローブの標的配列に無関係であり、すなわち、ハイブリッド形成がなかった場合、アーム1とアーム2間のアニーリングから得られたヘアピン高次構造は、プローブに対して本質的に唯一可能な二次構造である。当業者は、所与のプローブに対するそのようなアームの選択方法を承知しているものとする。

#### 【0034】

例えば、可能なビーコン型式には

#### 【0035】

#### 【表1】

TGCGC-(プローブ配列)-GCGCA

GCGCA-(プローブ配列)-TGCGC

AGCGC-(プローブ配列)-GCGCT

GCGCT-(プローブ配列)-AGCGC

CGCGA-(プローブ配列)-TCGCG

CGCGC-(プローブ配列)-GCGCG.

が含まれる。

#### 【0036】

本明細書において、フルオロフォアとは当技術分野で公知の任意の蛍光マーカ／色素と解釈される。そのような適当な蛍光マーカの例にはFam、Hex、Tet、Joe、Rox、Tamra、Max、Edans、Cy色素、例えば、Cy5、フルオレセイン、クマリン、エオシン、ローダミン、Bodipy、Alexa、カスケードブルー、Yakima Yellow、ルシファーイエロー、テキサスレッド（これら全ては登録商標）がある。

#### 【0037】

本明細書において本発明者らは、クエンチャーとは、当技術分野で公知の任意のクエンチャーであると解釈する。そのようなクエンチャーの例には、Dabcyl、Dark Quencher、Eclipse Dark Quencher、ElleQuencher、Tamra、BHQ、QSY（それら全ては登録商標）がある。

#### 【0038】

プローブを設計する場合、どの色素／クエンチャーの組合せが適当であるか、当業者は

承知しているものとする。

【0039】

本発明によれば好ましい態様では、前記プローブのスペクトル特性は、互いに干渉しないように選択することができる。特に、マルチプレックスでプローブを使用する場合、各単一プローブには、互いにスペクトルが著しく異なる、すなわち吸収／発光スペクトルが本質的に重なり合わないそれ自体のフルオロフォアを含めることができる。これにより、個々のシグナルが検出時に互いに干渉し合わないのを確実にし、全ての単一プローブを有利に低ノイズでマルチプレックス検出できるようになる。マルチプレックス法において一緒に使用できる色素の例には、FamとTamra、FamとTamraとテキサスレッドが含まれる。

10

【0040】

本発明によれば、得られたオリゴヌクレオチドは全て、別々にしておくことも、または部分的に混合し、または完全に混合することもできる。

【0041】

前記オリゴヌクレオチドは、当業者の判断次第で、乾燥形態で、または適当な溶媒に溶解して提供することができる。適当な溶媒には、TE、PCR等級水などがある。

【0042】

以後、配列番号によって配列を同定する。

【0043】

対応する配列は、本明細書に添付した図中の表に示す。前記表では、縮重ヌクレオチドの標準コードが使用されている。特に、R=GまたはA、Y=CまたはT、W=AまたはTである。

20

【0044】

所与の配列において、数個の位置が縮重している箇所では、各縮重位置を互いに独立して選択できることは当業者には明白である。例えば、RYはGC、GT、AC、AT、それらの組合せおよび混合物であってよい。従って、配列番号52は、配列番号25～51（表を参照）、またはそれらの組合せもしくは混合物などのどれか一つでよい。

【0045】

さらに、前記表中、dは縮重したオリゴヌクレオチドを示し、eは伸張したオリゴヌクレオチド（すなわち、別のオリゴヌクレオチドの延長形）を示し、lはループオリゴヌクレオチドを示す。

30

【0046】

本明細書において本発明者らは、ループオリゴヌクレオチドとは、任意のオリゴヌクレオチドの3'末端に相補するように、数個のヌクレオチド（一般的に、3、4、5、6、または7nt）を加えることによって5'末端を改変した任意のオリゴヌクレオチドであると解釈する。それによって、前記ループオリゴヌクレオチドは、所与のストリンジェンシー条件下で、ループ高次構造をとることができるという有利な特徴を有する。この特徴は、PCRプロトコル、特に、マルチプレックスプロトコルにおいて、プライマー同士間、またはプライマーとプローブとの間における相互作用を回避することによって、特異性および感受性を増加させる際に極めて有利である。

40

【0047】

本発明は、HIVを検出する方法を提供する。

【0048】

一局面では、本発明は、少なくとも一つのHIV標的を検出する方法であって、少なくとも2つのオリゴヌクレオチドによって、少なくとも一つの単位複製配列を生成するステップを含み、

該オリゴヌクレオチドが、

— K03455 HIV1-M 基準分離体の位置4281～4436（配列番号2）；  
および該HIV1-M分離体の位置4281～4429（配列番号306）、4283～4429（配列番号307）、4283～4431（配列番号308）から選択される配

50

列番号2のフラグメント；

－ L 2 0 5 8 7 H I V 1－O 基準分離体の位置 4 3 3 6～4 4 9 1（配列番号4）、  
および該H I V 1－O 分離体の位置 4 3 3 6～4 4 8 4（配列番号3 1 0）、4 3 3 8～  
4 4 8 4（配列番号3 1 1）から選択される配列番号4のフラグメント；

－ M 3 0 5 0 2 H I V 2 基準分離体の位置 4 8 8 9～5 0 3 6（配列番号5）；

－ K 0 3 4 5 5 H I V 1－M 基準分離体の位置 4 1 7 6～4 4 3 6（配列番号1）、  
および該H I V 1－M 分離体の位置 4 1 7 6～4 4 2 9（配列番号3 0 5）と同一である  
、配列番号1のフラグメント；ならびに

－ L 2 0 5 8 7 H I V 1－O 基準分離体の位置 4 2 3 1～4 4 9 1（配列番号3）、  
および該H I V 1－O 分離体の位置 4 2 3 1～4 4 8 4（配列番号3 0 9）と同一である  
、配列番号3のフラグメント；

10

からなる群から選択される少なくとも一つの基準鋳型配列の特異的増幅で使用するのに適  
当である方法を提供する。

#### 【0 0 4 9】

従って、基準鋳型配列は、決定したH I V 分離体の単離したフラグメントに対応する（  
すなわち、指摘した位置から伸張する配列と同一であるフラグメント）。従って、少なく  
とも前記基準鋳型配列の特異的増幅で使用するのに適当なオリゴヌクレオチドは、この基  
準鋳型配列を標的とするために、単離したフラグメントの形状で、この基準鋳型配列を増  
幅するような位置内で選択される。

#### 【0 0 5 0】

20

別の局面では、本発明は、少なくとも一つのH I V 標的を検出する方法であって、少な  
くとも2つのオリゴヌクレオチドによって、少なくとも一つの単位複製配列を生成するス  
テップ

ここで、前記オリゴヌクレオチドは、

－ K 0 3 4 5 5 H I V 1－M 基準分離体の位置 4 2 8 1～4 4 3 6（配列番号2）；  
および該H I V 1－M 分離体の位置 4 2 8 1～4 4 2 9、4 2 8 3～4 4 2 9、4 2 8 3  
～4 4 3 1から選択される配列番号2のフラグメント（配列番号3 0 6、3 0 7、および  
3 0 8）；

－ L 2 0 5 8 7 H I V 1－O 基準分離体の位置 4 3 3 6～4 4 9 1（配列番号4）、  
および該H I V 1－O 分離体の位置 4 3 3 6～4 4 8 4、4 3 3 8～4 4 8 4から選択さ  
れる配列番号4のフラグメント（配列番号3 1 0および3 1 1）；

30

－ M 3 0 5 0 2 H I V 2 基準分離体の位置 4 8 8 9～5 0 3 6（配列番号5）；

－ K 0 3 4 5 5 H I V 1－M 基準分離体の位置 4 1 7 6～4 4 3 6（配列番号1）、  
および該H I V 1－M 分離体の位置 4 1 7 6～4 4 2 9（配列番号3 0 5）と同一である  
、配列番号1のフラグメント；ならびに

－ L 2 0 5 8 7 H I V 1－O 基準分離体の位置 4 2 3 1～4 4 9 1（配列番号3）、  
および該H I V 1－O 分離体の位置 4 2 3 1～4 4 8 4（配列番号3 0 9）と同一である  
、配列番号3のフラグメント；

からなる群から選択される少なくとも一つの基準鋳型配列の特異的増幅で使用するのに適  
当な「定量に配慮されている」かつ／または「マルチプレックス法に配慮されている」プ  
ライマーである、

40

を含む方法を提供する。

#### 【0 0 5 1】

別の局面では、本発明は、少なくとも一つのH I V 標的を検出する方法であって、

－ K 0 3 4 5 5 H I V 1－M 基準分離体の位置 4 2 8 1～4 4 3 6（配列番号2）；  
および該H I V 1－M 分離体の位置 4 2 8 1～4 4 2 9、4 2 8 3～4 4 2 9、4 2 8 3  
～4 4 3 1から選択される配列番号2のフラグメント；

－ L 2 0 5 8 7 H I V 1－O 基準分離体の位置 4 3 3 6～4 4 9 1（配列番号4）、  
および該H I V 1－O 分離体の位置 4 3 3 6～4 4 8 4、4 4 3 8～4 4 8 4から選択さ  
れる配列番号4のフラグメント；

50

ー M30502 HIV2 基準分離体の位置 4889～5036（配列番号 5）；  
ー K03455 HIV1-M 基準分離体の位置 4176～4436（配列番号 1）、  
および該 HIV1-M 分離体の位置 4176～4429 と同一である、配列番号 1 のフラグメント；ならびに  
ー L20587 HIV1-O 基準分離体の位置 4231～4491（配列番号 3）、  
および該 HIV1-O 分離体の位置 4231～4484 と同一である、配列番号 3 のフラグメント；  
からなる群から選択される少なくとも一つの基準鋳型配列を増幅するステップを含む方法を提供する。

**【0052】**

10

好ましい態様では、前記方法は少なくとも一つのプローブによって該単位複製配列を検出するステップを含む。

**【0053】**

用語、単位複製配列は、当業者には公知である。本明細書において本発明者らは、単位複製配列とは、任意の増幅生成物であると解釈する。

**【0054】**

増幅は当技術分野では公知であり、少なくとも一回の増幅ステップ、特に、少なくとも一回の PCR または P C R を基にした増幅ステップが関与する任意の方法でありうる。

**【0055】**

本明細書において本発明者らは、「マルチプレックス法に配慮されている (multiplex-friendly)」オリゴヌクレオチドとは、マルチプレックス (PCR) プロトコルで首尾よく使用することができる任意のオリゴヌクレオチドであると解釈する。特に、「マルチプレックス法に配慮されている」オリゴヌクレオチドによって、マルチプレックスプロトコルで特異的かつ高感度な結果が得られる。

20

**【0056】**

本明細書において本発明者らは、「定量に配慮されている (quantitative friendly)」オリゴヌクレオチドとは、定量 (PCR) プロトコルで首尾よく使用することができる任意のオリゴヌクレオチドであると解釈する。特に、「定量に配慮されている」オリゴヌクレオチドによって、特異的、高感度、かつ定量的結果が得られる。

**【0057】**

30

本明細書では、別の配列に相補的な配列は、前記他の配列に、その配列の全長にわたって相補的な配列を意味する。

**【0058】**

本発明による方法は、マルチプレックスプロトコルの枠組み内で有利に実施することができるが、単一プロトコル、例えば、単一エンドポイントプロトコルまたは定性プロトコルとしても実施できることは明白である。

**【0059】**

本明細書において本発明者らは、基準鋳型配列とは、整列化の基準として使用することができる任意の鋳型配列であると解釈する。例えば、数個のゲノムを基準ゲノムとみなす。配列の整列化は当技術分野で公知である。

40

**【0060】**

有利には本発明によれば、配列番号 1～5 および上記したそのフラグメントは、HIV1-M、HIV1-O、HIV2-A、および HIV2-B のサブタイプの少なくとも一つの定量的検出ができるようにするプライマーを構築および生成するのに適した基準であるという特異的技術的特徴を共有する基準鋳型配列である。該基準鋳型配列は

ー 前記 HIV サブタイプの少なくとも一つのリアルタイムでの定量的検出、  
ー 前記 HIV サブタイプの少なくとも一つのマルチプレックス検出、  
ー 前記 HIV サブタイプの少なくとも一つのリアルタイムでの定量的マルチプレックス検出  
を可能にするプライマーを構築生成するのに適した基準である。

50

## 【0061】

本発明の基準鋳型配列は、特に、

- － K 0 3 4 5 5 H I V 1－M基準分離体の位置 4 1 7 6～4 4 3 6（配列番号 1）、および該 K 0 3 4 5 5 H I V 1－M 基準分離体の位置 4 2 8 1～4 4 3 6（配列番号 2）、4 2 8 1～4 4 2 9、4 2 8 3～4 4 2 9、4 2 8 3～4 4 3 1、および 4 1 7 6～4 4 2 9から選択される配列番号 1 のフラグメント；
  - － L 2 0 5 8 7 H I V 1－O基準分離体の位置 4 2 3 1～4 4 9 1（配列番号 3）、および該 L 2 0 5 8 7 H I V 1－O基準分離体の位置 4 3 3 6～4 4 9 1（配列番号 4）、4 3 3 6～4 4 8 4、4 3 3 8～4 4 8 4、および 4 2 3 1～4 4 8 4から選択される配列番号 3 のフラグメント；
  - － M 3 0 5 0 2 H I V 2基準分離体の位置 4 8 8 9～5 0 3 6（配列番号 5）；
- からなる群から選択される配列を含む。

10

## 【0062】

従って、本発明による方法により、リアルタイムでの定量的および／またはマルチプレックス増幅プロトコルによって、主たる H I V のグループおよび／またはタイプおよび／またはサブタイプ、ならびにおそらく事実上任意の H I V のグループおよび／またはタイプおよび／またはサブタイプが特異的に高感度で有利に検出できるようになる。本発明による方法がカバーする、そのようなグループおよび／またはタイプおよび／またはサブタイプの例には、H I V 1－Mサブタイプ A（A 1 および A 2）、B、C、D、F（F 1 および F 2）、G、H、J および K が含まれるが、組換え形 A E、A G、A B、D F、B C、C D、B F と B G、さらに U（高度に分岐している）も含まれる。その他の例には H I V 2 サブタイプ A、B が含まれる。

20

## 【0063】

従って、本発明は、核酸増幅による H I V 検出法であって、

- － グループ、および／またはタイプ、および／またはサブタイプ特異的であってよく、
  - － 定量的であり、より具体的にはリアルタイムで定量的に H I V を検出できるようにし、
  - － 依然として特異性を残したまま、マルチプレックス法で実行することができ、（リアルタイムであってよい）定量的なマルチプレックス増幅プロトコルで実行することさえできる
- 検出法を提供する。

30

## 【0064】

従って、本発明による方法は、H I V 1－M と H I V 1－O グループを H I V 2 グループから区別することによって、および、単一手順を使用して非常に広範な H I V タイプおよび／またはサブタイプをカバーすることによって診断手順を有利に容易にすることができる。

## 【0065】

本発明の一局面では、該基準鋳型配列は、K 0 3 4 5 5 H I V 1－M 基準分離体から得た配列番号 2、または位置 4 2 8 1～4 4 2 9、4 2 8 3～4 4 2 9、4 2 8 3～4 4 3 1 から選択される配列番号 2 のフラグメントである。

40

## 【0066】

一態様では、該基準鋳型配列は、K 0 3 4 5 5 H I V 1－M 基準分離体から得た配列番号 2、または該配列番号 2 のフラグメントの一つであり、前記方法は

- － 配列番号 9、1 2、1 4、1 5、2 4、5 2、8 2、9 1、1 0 0、1 0 9、1 1 8、1 2 7、1 3 6、および配列番号 9 1、1 0 0、1 0 9、1 1 8、1 2 7、1 3 6 の一つに、この配列番号の全長にわたって相補的な配列
- からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチドを用いて実施される。

## 【0067】

好ましい態様では、前記方法は

- － 配列番号 9、1 2、1 4、1 5、2 4、5 2、8 2 からなる群から選択した少なくと

50

も一つのプライマー  
を用いて実施される。

【0068】

別の態様では、前記方法は

ー 配列番号91、100、109、118、127、136、およびそれらの相補配列  
からなる群から選択した少なくとも一つのプローブ  
を用いて実施される。

【0069】

より好ましい態様では、前記方法は

ー 配列番号9、12、14、15からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー 10  
、および  
ー 配列番号24、52、82からなる群から選択した少なくとも一つのプライマーを用  
いて実施される。

【0070】

さらにより好ましい態様では、前記方法は

ー 配列番号9、12、14、15からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー  
、および  
ー 配列番号24、52、82からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー、お  
よび場合により、  
ー 配列番号91、100、109、110、118、127、136、およびそれらの 20  
相補配列からなる群から選択した少なくとも一つのプローブ  
を用いて実施される。

【0071】

すなわち、プライマー（プライマー対）の可能な組合せは

【0072】

【表2】

| 配列番号 | 9 | 12 | 14 | 15 |
|------|---|----|----|----|
| 24   | X | X  | X  | X  |
| 52   | X | X  | X  | X  |
| 82   | X | X  | X  | X  |

30

【0073】

〔表中、Xは、プライマーが対として互いに組み合わせることができ、加えて各プライマ  
ー対が

ー 配列番号91、100、109、110、118、127、136、およびそれらの  
相補配列  
からなる群から選択されるプローブのどれか一つと組み合わせて使用できることを示す〕  
の通りである。 40

【0074】

本発明の別の局面では、該基準鋳型配列は、L20587 HIV1-O基準分離体か  
ら得た配列番号4、または4336～4484、4338～4484から選択される配列  
番号4のフラグメントである。

【0075】

本発明の一態様では、前記基準鋳型配列は、L20587 HIV1-O基準分離体か  
ら得た配列番号4または配列番号4の該フラグメントの一つであり、前記方法は  
ー 配列番号148、157、167、170、179、189、190～194、およ  
び配列番号190～194の一つに、この配列番号の全長にわたって相補的な配列  
からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチドを用いて実施される。 50

## 【0076】

好ましい態様では、前記方法は

- － 配列番号148、157、167、170、179、189からなる群から選択した少なくとも一つのプライマーを用いて実施される。

## 【0077】

別の態様では、前記方法は

- － 配列番号190～194およびそれらの相補配列からなる群から選択した少なくとも一つのプローブを用いて実施される。

10

## 【0078】

より好ましい態様では、前記方法は

- － 配列番号148、157、167からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー、および
- － 配列番号170、179、189からなる群から選択した少なくとも一つのプライマーを用いて実施される。

## 【0079】

さらにより好ましい態様では、前記方法は

- － 配列番号148、157、167からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー、および
- － 配列番号170、179、189からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー、および場合により、
- － 配列番号190～194およびそれらの相補配列からなる群から選択した少なくとも一つのプローブを用いて実施される。

20

## 【0080】

すなわち、プライマー（プライマー対）の可能な組合せは

## 【0081】

## 【表3】

30

| 配列番号 | 148 | 157 | 167 |
|------|-----|-----|-----|
| 170  | X   | X   | X   |
| 179  | X   | X   | X   |
| 189  | X   | X   | X   |

## 【0082】

[表中、Xは、プライマーが対として互いに組み合わせることができ、加えて各プライマー対が

40

- － 配列番号190、191、192、193、194、およびそれらの相補配列からなる群から選択されるプローブのどれか一つと組み合わせて使用できることを示す]
- の通りである。

## 【0083】

本発明の別の局面では、該基準鋳型配列がM30502 HIV2基準分離体から得た配列番号5である。

## 【0084】

本発明の一態様では、該基準鋳型配列がM30502 HIV2基準分離体から得た配列番号5であり、前記方法は

50

ー 配列番号 221、249、276、287、296、297～303、および配列番号 297～303 の一つに、この配列番号の全長にわたって相補的な配列からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチドを用いて実施される。

【0085】

好ましい態様では、前記方法は

ー 配列番号 221、249、276、287、296 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマーを用いて実施される。

【0086】

別の態様では、前記方法は

ー 配列番号 297～303、およびそれらの相補配列からなる群から選択した少なくとも一つのプローブを用いて実施される。

【0087】

より好ましい態様では、前記方法は

ー 配列番号 221、249 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー、および  
ー 配列番号 276、287、296 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマーを用いて実施される。

【0088】

さらにより好ましい態様では、前記方法は

ー 配列番号 221、249 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー、および  
ー 配列番号 276、287、296 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー、および場合により、  
ー 配列番号 297～303、およびそれらの相補配列からなる群から選択した少なくとも一つのプローブを用いて実施される。

【0089】

すなわち、プライマー（プライマー対）の可能な組合せは

【0090】

【表 4】

| 配列番号 | 221 | 249 |
|------|-----|-----|
| 276  | X   | X   |
| 287  | X   | X   |
| 296  | X   | X   |

【0091】

〔表中、X は、プライマーが対として互いに組み合わせることができ、加えて各プライマー対が

ー 配列番号 297、298、299、300、301、302、303、およびそれらの相補配列からなる群から選択されるプローブのどれか一つと組み合わせて使用できることを示す〕の通りである。

【0092】

本発明の別の局面では、該基準鋳型配列は K03455 HIV1-M 基準分離体の配

10

20

30

40

50

列番号 1、または該 K 0 3 4 5 5 H I V 1 - M 基準分離体の位置 4 1 7 6 ~ 4 4 2 9 と同一である、配列番号 1 のフラグメントである。

【0093】

本発明の一態様では、該基準鋳型配列は K 0 3 4 5 5 H I V 1 - M 基準分離体の配列番号 1 であり、またはそのフラグメントであり、前記方法は

ー 配列番号 6、24、52、82、91、100、109、118、127、136、および配列番号 91、100、109、118、127、136 の一つに、この配列番号の全長にわたって相補的な配列

からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチドを用いて実施される。

【0094】

好ましい態様では、前記方法は

ー 配列番号 6、24、52、82 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマーを用いて実施される。

【0095】

別の態様では、前記方法は

ー 配列番号 91、100、109、118、127、136、およびそれらの相補配列からなる群から選択した少なくとも一つのプローブを用いて実施される。

【0096】

より好ましい態様では、前記方法は

ー 配列番号 6 である選択した少なくとも一つのプライマー、および

ー 配列番号 24、52、82 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマーを用いて実施される。

【0097】

さらにより好ましい態様では、前記方法は

ー 配列番号 6 である選択した少なくとも一つのプライマー、および

ー 配列番号 24、52、82 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー、および場合により、

ー 配列番号 91、100、109、118、127、136、およびそれらの相補配列からなる群から選択した少なくとも一つのプローブを用いて実施される。

【0098】

すなわち、プライマー（プライマー対）の可能な組合せは

【0099】

【表 5】

| 配列番号 | 24 | 52 | 82 |
|------|----|----|----|
| 6    | X  | X  | X  |

【0100】

〔表中、X は、プライマーが対として互いに組み合わせることができ、加えて各プライマー対が

ー 配列番号 91、100、109、118、127、136、およびそれらの相補配列からなる群から選択されるプローブのどれか一つと組み合わせて使用できることを示す〕の通りである。

【0101】

本発明の別の局面では、該基準鋳型配列は L 2 0 5 8 7 H I V 1 - O 基準分離体から得た配列番号 3、または該 L 2 0 5 8 7 H I V 1 - O 基準分離体の位置 4 2 3 1 ~ 4 4 8 4 と同一である、配列番号 3 のフラグメントである。

【0102】

本発明の一態様では、該基準鋳型配列は L 2 0 5 8 7 H I V 1 - O 基準分離体から得

10

20

30

40

50

た配列番号 3 またはそのフラグメントであり、前記方法は

ー 配列番号 139、170、179、189、190～194、および配列番号 190～194 の一つに、この配列番号の全長にわたって相補的な配列からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチドを用いて実施される。

【0103】

好ましい態様では、前記方法は

ー 配列番号 139、170、179、189 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマーを用いて実施される。

【0104】

別の態様では、前記方法は

ー 配列番号 190～194 およびそれらの相補配列からなる群から選択した少なくとも一つのプローブを用いて実施される。

【0105】

より好ましい態様では、前記方法は

ー 配列番号 139 である少なくとも一つのプライマー、および  
ー 配列番号 170、179、189 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマーを用いて実施される。

【0106】

さらにより好ましい態様では、前記方法は

ー 配列番号 139 である少なくとも一つのプライマー、および  
ー 配列番号 170、179、189 からなる群から選択した少なくとも一つのプライマー、および場合により、  
ー 配列番号 190～194 およびそれらの相補配列からなる群から選択した少なくとも一つのプローブを用いて実施される。

【0107】

すなわち、プライマー（プライマー対）の可能な組合せは

【0108】

【表 6】

| 配列番号 | 170 | 179 | 189 |
|------|-----|-----|-----|
| 139  | X   | X   | X   |

【0109】

〔表中、X は、プライマーが対として互いに組み合わせることができ、加えて各プライマー対が

ー 配列番号 190、191、192、193、194、およびそれらの相補配列からなる群から選択されるプローブのどれか一つと組み合わせて使用できることを示す〕の通りである。

【0110】

本発明の一局面では、少なくとも一つの単位複製配列を生成する前記ステップが、少なくとも一つの定量および／または定性的、マルチプレックスおよび／または単一 PCR 増幅を含む。

【0111】

本発明の別の局面では、該検出ステップはリアルタイムの、かつ／または定量的、かつ

10

20

30

40

50

／またはエンドポイントでの検出を優先的に含む。

【0112】

別の局面では、本発明は、上記方法によって、すなわち、本発明の方法をHIV含有試料に実施することによって得られる単位複製配列を提供する。

【0113】

別の局面では、本発明による少なくとも一つの単位複製配列を含む増幅組成物を提供する。本明細書において本発明者らは、増幅組成物とは増幅、特に、PCRによって得られる任意の組成物であると解釈する。

【0114】

本発明は、単一増幅実施(run)において少なくともHIV1-M、HIV1-O、HIV2-A、およびHIV2-Bをカバーするためのマルチプレックスで使用できると同時に、依然としてリアルタイムの定量的なそれらの増幅を提供できるプライマーの設計において、基準鋳型配列として使用するのに適当なポリヌクレオチドも対象とする。当然、本発明によるポリヌクレオチドは、単一プロトコル、マルチプレックスプロトコル、エンドポイントプロトコル、定性プロトコル、定量プロトコル、それらの組合せなどを含む別のプロトコルにも適切である。

【0115】

本明細書において本発明者らは、ポリヌクレオチドとは、任意のヌクレオチドポリマーであると解釈し、ここで、ヌクレオチドはリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、縮重ヌクレオチドなどであってよい。前記ヌクレオチドは、一本鎖であることが好ましいが、二本鎖であってもよい。該ポリヌクレオチドの長さは、様々であってよく、通常、500ヌクレオチド(nt)以下であり、好ましくは50～400nt、より好ましくは100～300nt、150～250ntの範囲がさらにいっそう好ましい。

【0116】

好ましい態様では、前記基準鋳型ポリヌクレオチドは、  
— K03455 HIV1-M 基準分離体の位置4281～4436(配列番号2)(図7参照)、または4281～4429、4283～4429、4283～4431から選択される配列番号2のフラグメントである。

【0117】

別の態様では、前記基準鋳型ポリヌクレオチドは、  
— L20587 HIV1-O基準分離体の位置4336～4491(配列番号4)(図7参照)、または4336～4484、4338～4484から選択される配列番号4のフラグメントである。

【0118】

別の態様では、前記基準鋳型ポリヌクレオチドは、  
— M30502 HIV2基準分離体の位置4889～5036(配列番号5)(図7参照)である。

【0119】

さらに別の態様では、前記基準鋳型ポリヌクレオチドは、  
— K03455 HIV1-M 基準分離体の位置4176～4436(配列番号1)(図7参照)、または該K03455 HIV1-M分離体の位置4176～4429と同一である、配列番号1のフラグメントである。

【0120】

別の態様では、前記基準鋳型ポリヌクレオチドは、  
— L20587 HIV1-O基準分離体の位置4231～4491(配列番号3)(図7参照)、または該L20587 HIV1-O分離体の位置4231～4484と同一である、配列番号3のフラグメントである。

【0121】

本発明によってHIVの検出に適当なオリゴヌクレオチドが提供される。図7～21を

参照されたい。

【0122】

一態様では、本発明は、

ー 配列番号6～304、および配列番号83～138、190～194、297～304の一つに、この配列番号の全長にわたって相補的な配列からなる群から選択されるオリゴヌクレオチドを提供する。

【0123】

好ましい態様では、本発明は、

ー 配列番号6、9、12、14、15、24、52、82、91、100、109、118、127、136、139、148、157、167、170、179、189、190～194、221、249、276、287、296、297～303、および

ー 配列番号91、100、109、118、127、136、190、191、192、193、194、297、298、299、300、301、302、303の一つに、この配列番号の全長にわたって相補的な配列からなる群から選択されるオリゴヌクレオチドを提供する。

10

【0124】

一局面では、本発明は、HIV1-Mの検出に适当であり、

ー 配列番号6、9、12、14、15、24、52、82、91、100、109、118、127、136、および配列番号91、100、109、118、127、136の一つに、この配列番号の全長にわたって相補的な配列からなる群から選択されるオリゴヌクレオチドを提供する。

20

【0125】

別の局面では、本発明は、HIV1-Oの検出に适当であり、

ー 配列番号139、148、157、167、170、179、189、190～194、および配列番号190～194の一つに、この配列番号の全長にわたって相補的な配列からなる群から選択されるオリゴヌクレオチドを提供する。

【0126】

さらに別の局面では、本発明は、HIV2-Aの検出に适当であり、

ー 配列番号221、249、276、287、296、297～299、および配列番号297～299の一つに、この配列番号の全長にわたって相補的な配列からなる群から選択されるオリゴヌクレオチドを提供する。

30

【0127】

さらに別の局面では、本発明は、HIV2-Bの検出に适当であり、

ー 配列番号221、249、276、287、296、300～303、および配列番号300～303の一つに、この配列番号の全長にわたって相補的な配列からなる群から選択されるオリゴヌクレオチドを提供する。

【0128】

配列番号9や配列番号12などの配列は縮重した配列であることに留意されたい。R=Aである配列番号9は配列番号8と同一であり、R=Aである配列番号12は配列番号11と同一である。

40

【0129】

別の局面では、本発明は、示した使用に适当的な以下のオリゴヌクレオチドを提供する。

【0130】

【表 7】

| 可能な使用             | 配列番号                 |
|-------------------|----------------------|
| HIV1-M フォワードプライマー | 6-15                 |
| HIV1-M リバースプライマー  | 16-82                |
| HIV1-M プローブ       | 83-138<br>(+その相補配列)  |
| HIV1-O フォワードプライマー | 139-167              |
| HIV1-O リバースプライマー  | 168-189              |
| HIV1-O プローブ       | 190-194<br>(+その相補配列) |
| HIV2 フォワードプライマー   | 195-249              |
| HIV2 リバースプライマー    | 250-296              |
| HIV2-A プローブ       | 297-299<br>(+その相補配列) |
| HIV2-B プローブ       | 300-303<br>(+その相補配列) |

10

20

【0131】

30

別の局面では、本発明は、示した使用に適当な以下のオリゴヌクレオチドを提供する。

【0132】

【表 8】

| 可能な使用             | 配列番号                                     |
|-------------------|------------------------------------------|
| HIV1-M フォワードプライマー | 6, 9, 12, 14, 15                         |
| HIV1-M リバースプライマー  | 24, 52, 82                               |
| HIV1-M プローブ       | 91, 100, 109, 118, 127, 136<br>(+その相補配列) |
| HIV1-O フォワードプライマー | 139, 148, 157, 167                       |
| HIV1-O リバースプライマー  | 170, 179, 189                            |
| HIV1-O プローブ       | 190 to 194<br>(+その相補配列)                  |
| HIV2 フォワードプライマー   | 221, 249                                 |
| HIV2 リバースプライマー    | 276, 287, 296                            |
| HIV2-A プローブ       | 297 to 299<br>(+その相補配列)                  |
| HIV2-B プローブ       | 300 to 303<br>(+その相補配列)                  |

10

20

【0133】

好ましい態様では、本発明は、以下のオリゴヌクレオチドを提供する。

【0134】

30

【表 9】

| 可能な使用                | 配列番号                            |
|----------------------|---------------------------------|
| HIV1-M ループフォワードプライマー | 14, 15                          |
| HIV1-M ループリバースプライマー  | 82                              |
| HIV1-M ビーコンプローブ      | 100, 109, 127, 136<br>(+その相補配列) |
| HIV1-O ループフォワードプライマー | 167                             |
| HIV1-O ループリバースプライマー  | 189                             |
| HIV1-O ビーコンプローブ      | 191, 192, 194<br>(+その相補配列)      |
| HIV2 ループフォワードプライマー   | 249                             |
| HIV2 ループリバースプライマー    | 287, 296                        |
| HIV2-A ビーコンプローブ      | 298-299<br>(+その相補配列)            |
| HIV2-B ビーコンプローブ      | 301-303<br>(+その相補配列)            |

## 【0135】

好ましい態様では、本発明による任意のヌクレオチドは蛍光標識することができる。

## 【0136】

別の局面では、本発明は、HIVの検出に適当なオリゴヌクレオチドのセットを提供する。

## 【0137】

一態様では、本発明は、HIV1-Mの検出に適当なオリゴヌクレオチドのセットを提供する。

## 【0138】

好ましい態様では、本発明は、HIV1-Mの検出に適当なオリゴヌクレオチドのセットであって、

- 配列番号 6、9、12、14、15 からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（プライマー）；および／または
- 配列番号 24、52、82 からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（プライマー）；および／または
- 配列番号 91、100、109、118、127、136、および配列番号 91、100、109、118、127、136 の一つに、この配列番号の全長にわたって相補的な配列からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（プローブ）；を含むオリゴヌクレオチドのセットを提供する。

## 【0139】

すなわち、オリゴヌクレオチドの可能な組合せは

【0140】

【表10】

| 配列番号 | 6 | 9 | 12 | 14 | 15 |
|------|---|---|----|----|----|
| 24   | X | X | X  | X  | X  |
| 52   | X | X | X  | X  | X  |
| 82   | X | X | X  | X  | X  |

10

【0141】

〔表中、Xは、オリゴヌクレオチドが対（プライマー対）として互いに組み合わせることができ、加えて各プライマー対が

－ 配列番号91、100、109、110、118、127、136、およびそれらの相補配列

からなる群から選択されるオリゴヌクレオチド（プローブ）のどれか一つと組み合わせて使用できることを示す〕

の通りである。

【0142】

別の局面では、本発明は、HIV1-Oの検出に適当なオリゴヌクレオチドのセットを提供する。

20

【0143】

好ましい態様では、本発明は、HIV1-Oの検出に適当なオリゴヌクレオチドのセットであって、

－ 配列番号139、148、157、167からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（プライマー）；および／または

－ 配列番号170、179、189からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（プライマー）；および／または

－ 配列番号190～194、および配列番号190～194の一つに、この配列番号の全長にわたって相補的な配列からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（プローブ）；

30

を含むオリゴヌクレオチドのセットを提供する。

【0144】

すなわち、オリゴヌクレオチドの可能な組合せは

【0145】

【表11】

| 配列番号 | 170 | 179 | 189 |
|------|-----|-----|-----|
| 139  | X   | X   | X   |
| 148  | X   | X   | X   |
| 157  | X   | X   | X   |
| 167  | X   | X   | X   |

40

【0146】

〔表中、Xは、オリゴヌクレオチドが対（プライマー対）として互いに組み合わせることができ、加えて各プライマー対が

－ 配列番号190、191、192、193、194、およびそれらの相補配列

からなる群から選択されるオリゴヌクレオチド（プローブ）のどれか一つと組み合わせて使

50

用できることを示す]  
の通りである。

【0147】

別の局面では、本発明は、H I V 2 - A の検出に適当なオリゴヌクレオチドのセットを提供する。

【0148】

好ましい態様では、H I V 2 - A の検出に適当なオリゴヌクレオチドのセットであって、

— 配列番号 221、249 からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（プライマー）；および／または

— 配列番号 276、287、296 からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（プライマー）；および／または

— 配列番号 297～299、および配列番号 297～299 の一つに、この配列番号の全長にわたって相補的な配列からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（プローブ）；

を含むオリゴヌクレオチドのセットが提供される。

【0149】

すなわち、オリゴヌクレオチドの可能な組合せは

【0150】

【表12】

| 配列番号 | 221 | 249 |
|------|-----|-----|
| 276  | X   | X   |
| 287  | X   | X   |
| 296  | X   | X   |

【0151】

〔表中、Xは、オリゴヌクレオチドが対（プライマー対）として互いに組み合わせることができ、加えて各プライマー対が

— 配列番号 297、298、299、およびそれらの相補配列からなる群から選択されるオリゴヌクレオチド（プローブ）のどれか一つと組み合わせて使用できることを示す〕

の通りである。

【0152】

別の局面では、本発明は、H I V 2 - B の検出に適当なオリゴヌクレオチドのセットを提供する。

【0153】

好ましい態様では、H I V 2 - B の検出に適当なオリゴヌクレオチドのセットであって、

— 配列番号 221、249 からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（プライマー）；および／または

— 配列番号 276、287、296 からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（プライマー）；および／または

— 配列番号 300～303、および配列番号 300～303 の一つに、この配列番号の全長にわたって相補的な配列からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（プローブ）；

を含むオリゴヌクレオチドのセットが提供される。

【0154】

すなわち、オリゴヌクレオチドの可能な組合せは  
 【0155】  
 【表13】

| 配列番号 | 221 | 249 |
|------|-----|-----|
| 276  | X   | X   |
| 287  | X   | X   |
| 296  | X   | X   |

10

【0156】

〔表中、Xは、オリゴヌクレオチドが対（プライマー対）として互いに組み合わせることができ、加えて各プライマー対が

— 配列番号300、301、302、303、およびそれらの相補配列からなる群から選択されるオリゴヌクレオチド（プローブ）のどれか一つと組み合わせて使用できることを示す〕  
 の通りである。

【0157】

別の局面では、本発明は、HIVのマルチプレックス検出に適当なオリゴヌクレオチド  
 のセットを提供する。

20

【0158】

好ましい態様では、HIVの検出、好ましくはマルチプレックス検出に適当なオリゴヌクレオチドのセットであって、

— 配列番号91、100、109、118、127、136、およびそれらの相補配列からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチド；および／または  
 — 配列番号190～194およびそれらの相補配列からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチド；および／または  
 — 配列番号297～299およびそれらの相補配列からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチド；および／または  
 — 配列番号300～303およびそれらの相補配列からなる群から選択した少なくとも一つのオリゴヌクレオチド；および／または  
 — それらの組合せ；

30

を含むオリゴヌクレオチドのセットが提供される。

【0159】

従って、本発明によるオリゴヌクレオチドのそのようなセットは、前記オリゴヌクレオチドの2、3、4、5、さらにそれ以上のそれらのいかなる組合せも含みうる。

【0160】

好ましい態様では、オリゴヌクレオチドのそのようなセットは、プローブの組合せ、例えば、HIV1-MプローブとHIV1-Oプローブの組合せでありうる。

40

【0161】

【表 1 4】

| 配列番号 | 91 | 100 | 109 | 118 | 127 | 136 |
|------|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 190  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |
| 191  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |
| 192  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |
| 193  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |
| 194  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |

10

## 【0 1 6 2】

(X＝可能な組合せ、場合により、任意のさらに別のプローブ、例えば、H I V 2－A やH I V 2－B プローブも用いられる)

## 【0 1 6 3】

別の態様では、オリゴヌクレオチドのそのようなセットは、プローブの組合せ、例えば、H I V 2－A プローブやH I V 2－B プローブの組合せでありうる。

## 【0 1 6 4】

【表 1 5】

| 配列番号 | 297 | 298 | 299 |
|------|-----|-----|-----|
| 300  | X   | X   | X   |
| 301  | X   | X   | X   |
| 302  | X   | X   | X   |
| 303  | X   | X   | X   |

20

## 【0 1 6 5】

(X＝可能な組合せ、場合により、任意のさらに別のプローブ、例えば、H I V 1－M やH I V 1－O プローブも用いられる)。

## 【0 1 6 6】

さらに可能なものには

## 【0 1 6 7】

【表 1 6】

| 配列番号 | 91 | 100 | 109 | 118 | 127 | 136 |
|------|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 297  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |
| 298  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |
| 299  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |
| 300  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |
| 301  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |
| 302  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |
| 303  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |

40

50

## 【0168】

(X＝可能な組合せ、場合により、任意のさらに別のプローブ、例えばH I V 1－Oも用いられる)

および

## 【0169】

## 【表17】

| 配列番号 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 297  | X   | X   | X   | X   | X   |
| 298  | X   | X   | X   | X   | X   |
| 299  | X   | X   | X   | X   | X   |
| 300  | X   | X   | X   | X   | X   |
| 301  | X   | X   | X   | X   | X   |
| 302  | X   | X   | X   | X   | X   |
| 303  | X   | X   | X   | X   | X   |

10

20

## 【0170】

(X＝可能な組合せ、場合により、任意のさらに別のプローブ、例えばH I V 1－Mも用いられる)

が含まれる。

## 【0171】

好ましい態様では、本発明によるオリゴヌクレオチドの任意のセットでは、該オリゴヌクレオチドの少なくとも一つが蛍光標識されている。

## 【0172】

本発明による少なくとも一つのオリゴヌクレオチド、および／または本発明によるヌクレオチドの少なくとも一つのセットによって得られる単位複製配列をさらに提供する。

30

## 【0173】

－ 配列番号9、12、14、もしくは15のプライマーと、配列番号24、52、もしくは82のプライマー；または

－ 配列番号148、157、もしくは167のプライマーと、配列番号170、179、もしくは189のプライマー；または

－ 配列番号221もしくは249のプライマーと、配列番号276、287、もしくは296のプライマー；または

－ 配列番号6のプライマーと、配列番号24、52、もしくは82のプライマー；または

－ 配列番号139のプライマーと、配列番号170、179、もしくは189のプライマー；

40

から選択した一对のプライマーを用いてH I V含有試料から増幅によって得た単位複製配列がより具体的に提供される。

## 【0174】

ヌクレオチド長が本発明の基準鋳型配列の一つのヌクレオチド（すなわち配列番号2、4、5、1または3および上記したそのフラグメント）の長さと同じであり、プローブ配列とのヌクレオチド同一率がこのプローブ配列の全長にわたって、少なくとも90%、好ましくは少なくとも91%、最も好ましくは少なくとも92%、最も好ましくは少なくとも93%、最も好ましくは少なくとも94%、最も好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも96%、最も好ましくは少なくとも97%、最も好ましくは少なくとも

50

も 98%、最も好ましくは少なくとも 99%、最も好ましくは 100% の配列を含む単位複製配列も提供し、ここで、このプローブ配列は、配列番号 91、100、109、118、127、136、190、191、192、193、194、297、298、299、300、301、302、303、およびこれらの配列番号の全長にわたってこれらの配列番号に相補的である配列の一つである。

【0175】

そのような単位複製配列を含む増幅組成物も本発明に含まれる。

【0176】

キットを提供することも本発明の別の目的である。

【0177】

好ましい態様では、前記キットは、上記のように本発明による少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（プライマーまたはプローブ）を含む。

【0178】

別の態様では、前記キットは、上記のように本発明による少なくとも一つのプライマー対を含む。

【0179】

さらに別の態様では、前記キットは、上記のように本発明による少なくともオリゴヌクレオチドのセット、例えば、本発明による少なくとも一組の複数のプローブを含む。

【0180】

本発明によるキットでは、オリゴヌクレオチド（プライマー、プローブ）は、別々にしておくことも、または部分的に混合し、または完全に混合することもできる。

【0181】

前記オリゴヌクレオチドは、当業者の判断次第で、乾燥形態で、または適当な溶媒に溶解して提供することができる。適当な溶媒には TE、PCR 等級水などが含まれる。

【0182】

好ましい態様では、本発明によるキットには、RT-PCR ステップに適当な試薬を含みうる、それ以上の PCR ステップに適当な試薬を含めることもできる。

【0183】

そのような試薬は当業者には公知であり、ヌクレアーゼ不含有水、RNase 不含有水、DNAse 不含有水、PCR 等級の水などの水；マグネシウム、カリウムなどの塩；Tris などの緩衝液；ポリメラーゼ、例えば、Taq、Vent、Pfu（それらの全ては登録商標）、活性化可能なポリメラーゼ、逆転写酵素などを含む酵素；デオキシヌクレオチド、ジデオキシヌクレオチド、dNTPs、dATP、dTTP、dCTP、dGTP、dUTP などのヌクレオチド；DTT 阻害薬および／または RNase 阻害薬などの他の試薬；およびポリ T、ポリ dT などのポリヌクレオチド、ならびに他のオリゴヌクレオチド、例えばプライマーが含まれる。

【0184】

別の好ましい態様では、本発明によるキットは PCR 対照を含む。そのような対照は当技術分野で公知であり、定性対照、正の対照、負の対照、内部標準、定量対照、内部定量対照、および較正範囲が含まれる。前記 PCR ステップの内部標準は、PCR ステップで標的鋳型に無関係な鋳型であってよい。そのような対照には、対照プライマーおよび／または対照プローブも含まれる。例えば、HIV 検出の場合には、内部標準として、人体から得られる試料には存在せず、そのサイズおよび GC 含有量が標的配列のそれと当量である遺伝子の中から選択した（例えば、植物の遺伝子由来の）ポリヌクレオチドを使用することができる。

【0185】

好ましい態様では、本発明によるキットは、生物試料、例えば、血液、血清、血漿から得た核酸を抽出し、かつ／または精製する手段を含む。そのような手段は当業者には周知である。好ましい態様では、本発明によるキットは、それを使用するための使用説明書を含む。前記使用説明書は、有利にはリーフレット、カードなどであってよい。前記使用説

10

20

30

40

50

明書は、2種の形態：おそらく文献データをも含むうる、キットおよびその使用についての情報を包括的に集めた詳細な形態；および、例えばカード型の、その使用に必要な情報を集めたクイックガイド形態もしくはメモを含むうる。

【0186】

好ましい態様では、前記キットは診断キット、特にインビトロ診断キット、すなわちHIV診断キットである。

【0187】

本発明は診断分野にも関する。

【0188】

本発明による上記のオリゴヌクレオチドは、HIVタイプおよびサブタイプのインビトロ診断に使用することができる。特に、本発明によるプライマーおよびプローブは、インビトロ試料、例えば、患者の血液、血漿および／または血清、あるいは細胞培養上清に存在するHIV核酸のインビトロタイピング、サブタイピング、および数量化に使用することができる。

【0189】

試料に存在するHIV核酸を検出する方法を提供することも本発明の目的である。

【0190】

一態様では、前記方法は、少なくとも一つのHIVタイプおよび／またはサブタイプおよび／または分離体から得た少なくとも一つの標的鋳型を含むことが推測される少なくとも一つの試料を提供するステップを含む。

【0191】

本明細書において本発明者らは、核酸とは、合成または非合成であっても、組換えまたは天然であっても、直鎖または環状であってもよい任意の核酸であると解釈する。これにはDNAおよびRNAが含まれる。核酸は、一本鎖もしくは二本鎖であっても、さらに三本鎖であってもよい。核酸は、様々な生物源、例えば、微生物（細菌、酵母など）、または哺乳動物細胞など、より高次の生物に由来してもよい。前記核酸はまた、ウイルス種、例えばHIV種などのレトロウイルス種であってもよい。核酸はまた、全DNA、全RNA、ゲノムDNA、ミトコンドリアDNA、プラスミドDNA、BAC DNA、およびそれらの混合物を含んでもよい。さらに、核酸は様々な純度状態が想定されうる。

【0192】

本明細書において本発明者らは、試料とは天然または非天然の任意の種類の試料であると解釈する。前記試料は、生物起源から得ることが好ましい。前記試料はまた、細胞培養上清から得てもよい。好ましい態様では、前記試料は血液から得る。試料を含有する前記核酸は、血清および／または血漿から得るのがより好ましい。前記試料は、予備ステップからも得られる。例えば、前記試料は、精製および／または抽出手順により、例えば血液試料から得られるだろう。特に、前記試料は、生物試料に対して実施される分離および／または精製および／または抽出方法から得ることができる。前記試料は対照試料であってもよい。対照試料は、定性対照、正の対照、負の対照、定量対照、および較正対照として試料を含む。前記対照は、内部標準および外部標準であってもよい。本発明による任意の試料は数度存在させてよい。例えば、前記試料は、二重、三重、四重・・・多重で提供してよく、これは定量実験の場合に有利である。

【0193】

当業者は、標的鋳型の概念に詳しいものとする。前記標的鋳型は、存在が前記方法で評価される任意の核酸であってもよい。前記標的鋳型は、前記方法（PCR単位複製配列）で増幅される核酸でありうるが、必ずしもというわけではない。

【0194】

前記方法は、少なくとも一種のHIVタイプおよび／またはサブタイプから得た、少なくとも一つの標的鋳型を含むことが推測される試料を含有する、少なくとも一つの核酸を提供するステップを含んでよい。

【0195】

本発明の一局面では、前記方法は、本発明による少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（例えばPCRプライマーおよび／またはプローブ）、および／または本発明によるヌクレオチドの少なくとも一つのセット（例えば、プライマー対）を提供するステップを含む。

【0196】

一態様では、前記方法は、前記プライマーおよび／または前記プライマー対および／または前記プローブを前記鋳型にアニーリングさせる条件下で、前記核酸含有試料と、本発明による少なくとも一つのオリゴヌクレオチド、および／または本発明によるヌクレオチドの少なくとも一つのセットとを接触させるステップを含む。

【0197】

別の局面では、前記方法は、アニール生成物の存在を観察し、または検出し、それによって前記試料中のHIV核酸の初期存在を明らかにするステップを含む。

【0198】

試料中のHIVタイプおよびサブタイプを定量的特異的に検出する方法を提供するのは本発明のさらに別の目的であり、リアルタイムでの定量マルチプレックスPCR分析が好ましい。

【0199】

一態様では、前記方法は、少なくとも一つのHIVタイプおよび／またはサブタイプから得た少なくとも一つの標的鋳型を含むと推測される少なくとも一種の試料を提供するステップを含む。

【0200】

別の好ましい態様では、前記方法は、本発明による少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（例えばPCRプライマーおよび／またはプローブ）および／または本発明によるヌクレオチドの少なくとも一つのセット（例えばプライマー対）を提供するステップを含む。

【0201】

好ましい態様では、前記プローブは前記プライマー対によって得られる推定HIV単位複製配列を検出するのに適している。

【0202】

本発明によれば好ましい態様では、前記プローブのスペクトル特性を互いに干渉しないように選択することができる。特に、プローブをマルチプレックス法で使用する場合、各単一プローブに互いにスペクトルが著しく異なる、すなわち、吸収／発光スペクトルは本質的に重複しないそれ自体のフルオロフォアを含めることができる。これにより、全ての単一プローブを有利に低ノイズでマルチプレックス検出できるようになり、個々のシグナルが検出時に互いに干渉し合わないのを確実にする。マルチプレックス法で一緒に使用することができる色素の例には、FamとTamra、FamとTamraおよびテキサスレッドが含まれる。

【0203】

別の好ましい態様では、前記方法は、前記オリゴヌクレオチドおよび／またはプライマー、および／または対、またはプライマーおよび／またはプローブ、および／またはオリゴヌクレオチドのセットの存在下、かつ恐らく適当な試薬の存在下で、前記プライマー対および／またはセットを含む前記標的鋳型のPCR増幅に適当な条件に前記試料を接触させるステップを含む。

【0204】

前記PCR増幅は、RT-PCRを含む任意のPCR反応でありうる。

【0205】

そのような適当な試薬は、当技術分野で公知であり、その例には、ヌクレアーゼ不含有、RNase不含有、DNase不含有、PCR等級水などの水；マグネシウム、カリウムなどの塩；Trisなどの緩衝液；ポリメラーゼ、例えば、Taq、Vent、Pfu（それらの全ては登録商標）、活性可能なポリメラーゼ、逆転写酵素などを含む酵素；デオキシヌクレオチド、ジデオキシヌクレオチド、dNTP、dATP、dTTP、dUT

10

20

30

40

50

P、d C T P、d G T Pなどのヌクレオチド；D T Tおよび／またはR N a s e阻害薬などの他の試薬；およびポリT、ポリd Tなどのポリヌクレオチドが含まれる。有利には本発明によれば、これらの試薬の少なくとも一部をプレミックスとして使用することができる。その使用量は当業者には公知である。

**【0206】**

好ましい態様では、本発明によるプライマーは終濃度範囲100～2000nMで使用する。典型的には、前記プライマーは、終濃度範囲200～1500nMで使うことができ、250～1000nMが好ましく、500～1000nMがより好ましく、600～1000nMがさらにいっそう好ましい。

**【0207】**

P C R反応でのプローブ濃度は、典型的には終濃度を50nMから1000nMに変えることによって最適化することができる。好ましい態様では、本発明によるプローブは、終濃度範囲50～1000nMで使われ、100～800nMが好ましく、100～600nMがより好ましく、200～600nMさらにいっそう好ましい。

**【0208】**

前記条件とは当業者には公知である。その条件には、温度条件、特に温度サイクリング条件、例えば、サイクル温度、サイクル持続時間、サイクル数、サイクル加熱速度が含まれる。好ましい態様では、前記温度条件はR T－P C Rに適切な条件を含み、別の好ましい態様では、前記条件はQ P C Rに適切な条件を含む。さらに別の好ましい態様では、前記条件は定量R T－P C Rに適切な条件を含む。

**【0209】**

別の態様では、前記方法は、前記プローブが存在し、前記プローブをアニーリングするのに適当な条件下で、前記試料を前記推定単位複製配列に導くステップを含む。

**【0210】**

さらに別の好ましい態様では、前記方法は、潜在的増幅生成物を少なくとも一度、好ましくはリアルタイムで検出、すなわち、前記プローブが、好ましくは各試料とアニールする前記単位複製配列と会合しているか否かを検出するステップを含む。これにより、前記H I Vタイプおよび／またはサブタイプの存在が有利に評価できるようになる。これは、蛍光強度を測定することによって有利に実現できる。蛍光測定手順は当技術分野で公知である。手短に言えば、試料をフルオロフォアの励起波長周辺で照射し発光強度を測定する。

**【0211】**

別の態様では、前記方法は、前記単位複製配列にアニールした前記プローブの量を少なくとも一度、好ましくはリアルタイムで測定するステップを含む。これは、蛍光強度を測定することにより有利に実現できる。蛍光測定手順は、当技術分野で公知である。手短に言えば、試料をフルオロフォアの励起波長周辺で照射し発光強度を測定する。

**【0212】**

別の好ましい態様では、前記方法は、前記試料中に初めに存在する標的鋳型のコピーの数を少なくとも一度見積もるステップを含む。当業者は、そのようなステップの実施方法を承知しているものとする。例えば、これは、較正標準および／または内部標準を使用して有利に実施することができる。好ましくは、このステップは、試料ごとのいわゆる閾値サイクル（C T）の決定を含み、それは前記試料中に初めに存在する標的鋳型のコピーの数に相関する。

**【0213】**

好ましい態様では、前記方法の少なくとも一つのステップ、好ましくはいくつかのステップ、より好ましくはステップの大部分をP C Rプレートで行うことができる。適当なそのようなP C Rプレートは当技術分野で公知である。それらのプレートには、24ウェルプレート、48ウェルプレート、96ウェルプレート、および284ウェルプレートが含まれる。これは、前記ステップにおいて試料を並行して確実に処理できるようにするのに有利である。さらに、これにより時間の節約に有利な高処理スクリーニングが可能になる

10

20

30

40

50

。

## 【0214】

別の好ましい態様では、前記方法の少なくとも一つのステップ、好ましくはいくつかのステップ、より好ましくは大部分のステップはサーマルサイクラーで行うことができる。リアルタイムで蛍光強度を測定するために、そのようなサーマルサイクラーを備えることができるであろう。その場合、前記プレートは有利に光学等級でありうる。

## 【0215】

本出願は、本発明による、少なくとも一つのオリゴヌクレオチド、および／またはPCRプライマー、および／または少なくとも一つのPCRプライマー対、および／または少なくとも一つのプローブ、および／またはヌクレオチドの少なくとも一つのセットを用いてHIV核酸を増幅することにも関する。

10

## 【0216】

本発明には、上記の好ましい特徴を任意の数で組み込めることは当業者なら理解できよう。本明細書に記載した引用は全て、これによりその全体が参照により組み入れられる。

## 【0217】

本発明の他の態様は本明細書に示されていないが、それらは当業者に明白であり、従って本発明の範囲および趣旨内にある。特に、マルチプレックスおよび／またはリアルタイムプロトコルによる検出に适当ではあるが、本発明の、方法、工程、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドセット、単位複製配列、およびキットは、一重プロトコル、定性プロトコル、定量プロトコル、エンドポイント検出プロトコル、およびそれらの組合せにも明らかに适当である。

20

## 【0218】

本発明による生成物、工程、および方法の利点は、単に例示として以下に示され、限定的ではない以下の実施例から明白になるであろう。

## 【0219】

(実施例)

## 実施例1

HIV2の検出(サブタイプAおよびB)(図1A、1B、2A、2Bおよび3)

本実施例は、HIV2サブタイプAおよびBをRT-PCR特異的にリアルタイムで検出できるようにする本発明のHIV2プライマーおよびプローブを例示する。

30

## 【0220】

本実施例には、一对のHIV2プライマー、および異なる2つのHIV2プローブの使用が関与する。一つのプローブはHIV2-Aプローブ(サブタイプAプローブ)であり、他方の一つはHIV2-Bプローブ(サブタイプBプローブ)である。これらのプライマーおよびプローブは、HIV2分離体の147bp配列を標的にする。

## 【0221】

それらは以下の配列を有する。

HIV2フォワードプライマー(H2A3f、配列番号195)：

## 【表18】

**AGGAAGRCARACAGCACTCTTC**ただしR=A/G (Tm = 66°C)

40

HIV2リバープライマー(H2A3r、配列番号250)：

## 【表19】

**GGTACTCCRAAGGGGTTTGTCTAT**ただしR=A/G (Tm = 65°)

## 【0222】

既に述べたように、RはAもしくはGに相当し、その結果、フォワードプライマーには4つの形態(AA、AG、GA、GG)およびリバープライマーには2形態(AGまたはGA)がある。

50

H I V 2 - A プローブ (H I V 2 - A プローブ、配列番号 2 9 7) :  
【表 2 0】

GGCCAATAACACACTTGCACACA

H I V 2 - B プローブ (H I V 2 - B プローブ、配列番号 3 0 0) :  
【表 2 1】

GCCTATCACACACCTGCACACA

【0 2 2 3】

10

これらのプローブのそれぞれを本実施例で分子ビーコンとして使用する。各プローブの各末端に付加されている、標的に無関係なビーコンアームを下線で示す (F A M = フルオロフォア、D Q = Dark Quencher)。

分子ビーコン型式の H I V 2 - A プローブ (H I V 2 - A ビーコンプローブ、S H 2 A 9 a、配列番号 2 9 8) :

【表 2 2】

FAM - AGCGCGGCCAATAACACACTTGCACACAGCGCT - DQ

分子ビーコン型式の H I V 2 - B プローブ (H I V 2 - B ビーコンプローブ、S H 2 A 1 b、配列番号 3 0 1) :

20

【表 2 3】

FAM - AGCGCGCCTATCACACACCTGCACACAGCGCT - DQ

【0 2 2 4】

リアルタイムでの定量的増幅実験を H I V 2 陽性血漿試料 (H I V 2 - A 陽性 H I V 2 - B 陰性試料および H I V 2 - B 陽性 H I V 2 - A 陰性試料) のパネルで三回連続実施する。

a) H I V 2 プライマー対 + H I V 2 - A ビーコンプローブ (H 2 A 3 f、H 2 A 3 r ; S H 2 A 9 a、配列番号 1 9 5、2 5 0、2 9 8)、

30

b) H I V 2 プライマー対 + H I V 2 - B ビーコンプローブ (H 2 A 3 f、H 2 A 3 r、S H 2 A 1 b、配列番号 1 9 5、2 5 0、3 0 1)、

c) H I V 2 プライマー対 + H I V 2 - A ビーコンプローブ + H I V 2 - B ビーコンプローブ。(H 2 A 3 f、H 2 A 3 r、S H 2 A 9 a、S H 2 A 1 b、配列番号 1 9 5、2 5 0、2 9 8、3 0 1)。

【0 2 2 5】

手順の詳細は以下の通りである。

ー H I V 2 陽性試料パネル: H I V 2 - A 陽性 H I V 2 - B 陰性血漿試料 (サブタイプ A の試料) および H I V 2 - B 陽性 H I V 2 - A 陰性血漿試料 (サブタイプ B の試料) を感染患者から得る (Centre Hospitalier Bichat, Laboratory of Virology, Assistance Publique - Hopitaux de Paris, フランス) ;

40

ー 負の対照: H I V 2 陰性血漿 ;

ー 核酸抽出: Kit Qiagen QiaAmp Viral RNA. (参照符号 5 2 9 0 4) を製造業者の指示書に従い使用 (抽出する試料の量 = 1 4 0 μ L) ;

ー プライマー対: 一反応につき各 1 μ M (配列番号 1 1、1 2) ;

ー プローブ: 上記 F A M - Dark Quencher ビーコンプローブ (配列番号 2 9 8、3 0 1) ; 一反応につき各 0. 2 μ M ;

ー R T - P C R 試薬: R N A s e 不含水、および Qiagen QuantiTect Probe R T - P C R キット (Qiagen 参照符号: 2 0 4 4 4 3) を製造業者の指示書に従い使用、[M g C l<sub>2</sub>] = 4 m M ;

50

- ー 装置：IQ-Cycler Bio-Rad；
- ー 温度サイクリング：
  - 42 °Cで30'（RTステップ）、
  - 95 °Cで15'（ポリメラーゼ活性化ステップ）、
  - （94 °Cで30"－55 °Cで30"－72 °Cで30"）×50
  - +4 °C

## 【0226】

プローブ一つのみ（実験a）およびb）、または両プローブ（実験c））と共にHIV2プライマー対を使用し、サブタイプAの試料およびサブタイプBの試料のパネルを核酸抽出およびRT-PCR増幅にかける。

10

## 【0227】

結果の解釈：各アッセイでは、増幅の初期サイクルで測定した蛍光のバックグラウンドレベルより著しく上と考えられる蛍光レベルである閾値サイクル（Ct）が決定される。Ct値は標的濃度に反比例する。つまり、Ctが下がるほど標的濃度は上がる。

## 【0228】

下表では、CT＝閾値サイクル；RFUmax＝PCR実施の最後で観察された最大相対蛍光単位；CTL－＝負の対照；N/A＝蛍光レベルがバックグラウンドレベルより低い試料。

## 【0229】

表1：実験a）でHIV2プライマー対＋HIV2－A分子ビーコンプローブを用いて得られた結果（H2A3f、H2A3r、SH2A9a、配列番号195、250、298）。

20

## 【0230】

## 【表24】

|                  |          |         |      |
|------------------|----------|---------|------|
| サブタイプA<br>の試料の希釈 | A1 1/10  | CT      | 20.2 |
|                  |          | RFUmax  | 916  |
|                  | GS 1/800 | CT      | 22   |
|                  |          | RFUmax  | 1078 |
|                  | A3 1/10  | CT      | 21.2 |
|                  |          | RFUmax  | 1382 |
| サブタイプB<br>の試料の希釈 | A4 1/10  | CT      | 22.4 |
|                  |          | RFUmax  | 1221 |
|                  | B1 1/10  | CT      | 42.9 |
|                  |          | RFUmax  | 67   |
|                  | B2 1/10  | CT      | 30.9 |
|                  |          | RFUmax  | 265  |
|                  | B3 1/10  | CT      | N/A  |
|                  |          | RFUmax  | 50   |
| 負の対照             | B4 1/10  | CT      | 37.8 |
|                  |          | RFUmax  | 52   |
|                  | CTL -    | CT      | N/A  |
|                  |          | RFU max | N/A  |

30

40

## 【0231】

これらの結果を図1Aおよび1Bにより例示する。

## 【0232】

有利には本発明によれば、HIV2－Aプローブ（SH2A9a、配列番号298）によって、サブタイプB陽性試料を交差検出しなくても、本発明によるHIV2プライマー（H2A3f、H2A3r、配列番号195、250）と組み合わせて、サブタイプA陽性試料を標的とする検出が可能になる（表1、図1Aおよび1Bを参照）。

## 【0233】

50

表 2：実験 b) で H I V 2 プライマー対 + H I V 2 - B プローブを用いて得られた結果 (H 2 A 3 f、H 2 A 3 r、S H 2 A 1 b、配列番号 1 9 5、2 5 0、3 0 1)。

【 0 2 3 4 】

【表 2 5】

|                   |          |         |      |      |
|-------------------|----------|---------|------|------|
| サブタイプ A<br>の試料の希釈 | A1 1/10  | CT      | 35.1 | 39.5 |
|                   |          | RFUmax  | 84   | 53   |
|                   | GS 1/800 | CT      | 36.8 | 40.5 |
|                   |          | RFUmax  | 81   | 57   |
|                   | A3 1/10  | CT      | 26.9 | 26.7 |
|                   |          | RFUmax  | 159  | 137  |
| サブタイプ B<br>の試料    | A4 1/10  | CT      | 44   | N/A  |
|                   |          | RFUmax  | 55   | -    |
|                   | B1 1/10  | CT      | 21.4 | 21.5 |
|                   |          | RFUmax  | 1018 | 996  |
|                   | B2 1/10  | CT      | 29.6 | 29.9 |
|                   |          | RFUmax  | 286  | 292  |
|                   | B3 1/10  | CT      | 26.3 | 27.2 |
|                   |          | RFUmax  | 768  | 690  |
| 負の対照              | B4 1/10  | CT      | 27   | 27.1 |
|                   |          | RFUmax  | 832  | 779  |
|                   | CTL -    | CT      | N/A  | N/A  |
|                   |          | RFU max | N/A  | N/A  |

10

20

【 0 2 3 5 】

これらの結果を図 2 A および 2 B により例示する。

【 0 2 3 6 】

有利には本発明によれば、H I V 2 - B プローブ (S H 2 A 1 b、配列番号 3 0 1) によって、サブタイプ A 陽性試料を交差検出しなくとも、本発明の H I V 2 プライマー (H 2 A 3 r、H 2 A 3 f、配列番号 1 9 5、2 5 0) と組み合わせて、サブタイプ B 陽性試料を標的とする検出が可能になる (表 2 を参照、図 2 A および 2 B)。

【 0 2 3 7 】

表 3：実験 c) で H I V 2 プライマー対 + H I V 2 - A プローブ + H I V 2 - B プローブを用いて得られた結果 (H 2 A 3 f、H 2 A 3 r、S H 2 A 9 a、S H 2 A 1 b、配列番号 1 9 5、2 5 0、2 9 8、3 0 1)。

【 0 2 3 8 】

30

【表 2 6】

|                  |          |         |      |      |
|------------------|----------|---------|------|------|
| サブタイプA<br>の試料の希釈 | A1 1/10  | CT      | 20.3 | 20.6 |
|                  |          | RFU max | 1673 | 1550 |
|                  | GS 1/800 | CT      | 23.7 | 23.9 |
|                  |          | RFU max | 1709 | 1580 |
|                  | A3 1/10  | CT      | 21.4 | 21.5 |
|                  |          | RFU max | 2439 | 2201 |
| サブタイプB<br>の試料    | A4 1/10  | CT      | 22.6 | 22.8 |
|                  |          | RFU max | 1974 | 1911 |
|                  | B1 1/10  | CT      | 23.3 | 23.6 |
|                  |          | RFU max | 1197 | 1122 |
|                  | B2 1/10  | CT      | 30.2 | 30.5 |
|                  |          | RFU max | 635  | 672  |
| 負の対照             | B3 1/10  | CT      | 28.6 | 28.7 |
|                  |          | RFU max | 814  | 834  |
|                  | B4 1/10  | CT      | 28.7 | 28.8 |
|                  |          | RFU max | 837  | 841  |
|                  | CTL -    | CT      | N/A  | N/A  |
|                  |          | RFU max | N/A  | N/A  |

10

20

## 【0 2 3 9】

これらの結果を図 3 により例示する。

## 【0 2 4 0】

本発明の際立つ特徴として、H I V 2 - A プローブ (S H 2 A 9 a、配列番号 2 9 8) および H I V 2 - B プローブ (S H 2 A 1 b、配列番号 3 0 1) は同時に使用することができ (表 3 および図 3 を参照)、一段階マルチプレックス (ここでは二重) 手順で両サブタイプが検出できるようになる。

## 【0 2 4 1】

驚くべき特徴として、A および B プローブの同時使用 (サブタイプ A プローブおよびサブタイプ B プローブ) (二重鎖プロトコル) において、単一プローブの単独使用 (サブタイプ A プローブまたはサブタイプ B プローブ) と比べて相乗効果が観察される。単一プローブで得られた検出シグナルは、両プローブでそれぞれ得られたものよりもわずかに不正確であり、それはサブタイプ A の試料について、実験 c) で得られた結果と実験 a) で得られた結果の比較、および、サブタイプ B の試料について実験 c) で得られた結果と、実験 b) で得られた結果の比較から判断することができる。

30

## 【0 2 4 2】

従って、本発明によるオリゴヌクレオチドセット (プライマーおよびプローブ) によって、プローブが同時に使用された場合 (マルチプレックス、二重プロトコル)、驚くべき予想外の相乗効果として、特異性が高まることが証明される。

## 【0 2 4 3】

40

## 実施例 2

H I V 1 - M / H I V 1 - O プライマーおよびプローブ (図 4 A および 4 B)

一回の実施で、H I V 1 - M 陽性 H I V 1 - O 陰性血清試料の代表的基準パネル (H I V 1 - M パネル試料) および H I V 1 - O 陽性 H I V 1 - M 陰性血清試料の代表的基準パネル (H I V 1 - O パネル試料) を、本発明の H I V 1 - M プライマー (H 1 B 4 f、H 1 B 1 0 r、配列番号 7、1 6) および H I V 1 - M プローブ (S H 1 B M 5、配列番号 1 1 9) を用いて、リアルタイムでの定量的 R T - P C R 増幅にかける。

## 【0 2 4 4】

別の実施では、本発明の H I V 1 - O プライマー (H 1 B 5 f、H 1 B 1 3 r、配列番号 1 4 0、1 6 8) および H I V 1 - O プローブ (S H 1 B O 2 配列番号 1 9 1 または S

50

H1B010配列番号194)を用いて同じパネルをリアルタイムでの定量的RT-PCR増幅にかける。

【0245】

HIV1プライマーおよびプローブは以下の配列を有する。

HIV1-Mプライマー

【0246】

【表27】

フォワード: TTGGAGAGCAATGGCTAGTGA (H1B4f, 配列番号7)

リバーズ: TGTGTGCAATCTAGTTGCCATA (H1B10r, 配列番号16)

10

【0247】

HIV1-Mプローブ

【0248】

【表28】

ATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTC (配列番号110)

【0249】

HIV1-Oプライマー

【0250】

【表29】

20

フォワード: TTGGAGAGCACTAGCTAGTGA (H1B5f, 配列番号140)

リバーズ: TGTGTGCAATCTATTTGCCATA (H1B13r, 配列番号168)

【0251】

HIV1-Oプローブ

【0252】

【表30】

GAAATCATTGCTAGTTGTCCTAAATGTCATAT (配列番号190)

【0253】

30

本発明によれば本明細書で、5'の標的に無関係なアームとして"TGCGC"、そして3'の標的に無関係なアームとして"GCCGA"（両アームに下線を引く）を用いて、各プローブは分子ビーコンとして生成される。5'アームをFAMフルオロフォアで標識し、3'アームをDark Quencherで標識する。

【0254】

次いで、プローブ配列は以下のものである。

【0255】

分子ビーコン型式のHIV1-Mプローブ

【0256】

【表31】

40

FAM-TGCGCATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCGCGCA-DQ

(SH1BM5, 配列番号119)

【0257】

分子ビーコン型式のHIV1-Oプローブ

【0258】

【表32】

FAM-TGCGCGAAATCATTGCTAGTTGTCCTAAATGTCATATGCGCA-DQ

(SH1B02, 配列番号191)

50

## 【0259】

RT-PCR手順の詳細は以下の通りである。

- － パネル：BBIパフォーマンスパネル参照符号PRD301（1ml当たり約 $10^5$ 個のコピー（copies）の割合で、ヒト血漿に希釈したHIV1-O培養物、試料番号の型式は301-xxであり、xxは試料番号である）を代表的なHIV1-Oパネルとして使用；
- － BBIパフォーマンスパネル参照符号PRD201（1ml当たり約 $10^5$ コピーの割合で、ヒト血漿に希釈したHIV1-M培養物、試料番号の型式は201-yyであり、yyは試料番号である）を代表的なHIV1-Mパネルとして使用する；
- － 負の対照：HIV1陰性血漿；
- － 抽出：キットQiagen QiaAmp Viral RNA（参照符号52904）を製造業者の指示書に従い使用（抽出する試料の量：140  $\mu$ L）；
- － プライマー対：HIV1-Oプライマー対（H1B5f、H1B13r、配列番号140、168）およびHIV1-M（H1B4F、H1B10r、配列番号7、16）プライマー対は、一反応につきそれぞれ0.6  $\mu$ Mで使用されている；
- － プローブ：FAM-Dark Quencherプローブ（SH1BM5、SH1BO2、配列番号119、191）一反応につき各0.6  $\mu$ M；
- － RT-PCR試薬：RNAse不含水、およびQiagen QuantiTect Probe RT-PCRキット（Qiagen参照符号：204443）、製造業者の指示書に従い使用、 $[MgCl_2] = 4$  mM；
- － 装置：IQ-Cycler Bio-Rad
- － 温度サイクリング：
  - 42  $^{\circ}$ Cで30'、
  - 95  $^{\circ}$ Cで15'、
  - (94  $^{\circ}$ Cで15"-55  $^{\circ}$ Cで30"-72  $^{\circ}$ Cで30")  $\times$  50,
  - + 4  $^{\circ}$ C。

10

20

## 【0260】

増幅実験の両タイプについて同じRT-PCR手順をその後行っている。

## 【0261】

結果の解釈：各アッセイでは、増幅の初期サイクルで測定した蛍光のバックグラウンドレベルより著しく上と考えられる蛍光レベルである閾値サイクル（Ct）が決定される。Ct値は標的濃度に反比例する。つまり、Ctが下がるほど標的濃度は上がる。

30

## 【0262】

下表では、

CT = 閾値サイクル；  
 RFU max = PCR実施の最後で観察された最大相対蛍光単位；  
 CTL = 負の対照；  
 N/A = 蛍光レベルがバックグラウンドレベルより低い試料；  
 Avg. : 平均；

## 【0263】

下表4に実験結果を例示する。

40

## 【0264】

【表 3 3】

| 試料        | グループ/<br>サブタイプ | HIV1-M プライマー<br>およびプローブ |      |             | HIV1-O プライマー<br>およびプローブ |      |             |
|-----------|----------------|-------------------------|------|-------------|-------------------------|------|-------------|
|           |                | CT                      |      | Avg         | CT                      |      | Avg         |
| 201-1     | A              | 37.6                    | 38.3 | <b>38.0</b> | 44.3                    | N/A  |             |
| 201-2     | B              | 29.0                    | 29.3 | <b>29.2</b> | N/A                     | N/A  |             |
| 201-3     | C              | 37.5                    | 38.8 | <b>38.2</b> | N/A                     | N/A  |             |
| 201-4     | D              | 34.1                    | 34.1 | <b>34.1</b> | N/A                     | N/A  |             |
| 201-5     | E              | 32.1                    | 35.2 | <b>33.7</b> | N/A                     | N/A  |             |
| 201-6     | F              | 28.1                    | 31.0 | <b>29.6</b> | N/A                     | N/A  |             |
| 201-7     | G              | 31.9                    | 32.0 | <b>32.0</b> | N/A                     | N/A  |             |
| 201-8     | H              | 35.2                    | 35.2 | <b>35.2</b> | N/A                     | N/A  |             |
| 201-9     | CTL -          | N/A                     | N/A  |             | N/A                     | N/A  |             |
| 301-1     | O              | N/A                     | N/A  |             | 32.4                    | 31.8 | <b>32.1</b> |
| 301-2     | O              | 41.1                    | N/A  |             | 33.0                    | 32.8 | <b>32.9</b> |
| 301-3     | O              | N/A                     | N/A  |             | 30.9                    | 31.0 | <b>31.0</b> |
| 301-4     | O              | N/A                     | 47.5 |             | N/A                     | 35.7 | <b>35.7</b> |
| 対照<br>(水) |                | N/A                     |      |             | N/A                     |      |             |
|           |                | N/A                     |      |             | N/A                     |      |             |
|           |                | N/A                     |      |             | N/A                     |      |             |

## 【0265】

図4Aおよび4Bにより結果を例示する。

## 【0266】

図4Aは、HIV1-Mパネル(BBI PRD201)、HIV1-Oパネル(BBI PRD301)、および対照において、本発明のHIV1-Mプライマー(H1B4f、H1B10r、配列番号7、16)およびHIV1-Mプローブ(SH1BM5、配列番号119)を用いて得られた結果を示す。

## 【0267】

図4Bは、HIV1-Oパネル、HIV1-Mパネル、および対照について、本発明のHIV1-Oプライマー(H1B5f、H1B13r、配列番号140、168)およびHIV1-Oプローブ(SH1BO2、配列番号191)を用いて得られた結果を示す。

## 【0268】

両事例では、HIV1-O試料において本発明のHIV1-Mプライマーおよびプローブを使用する場合、ならびにその逆も、定量的リアルタイムRT-PCRでは増幅は検出されない。

## 【0269】

有利には本発明によれば、HIV1-M単位複製配列とHIV1-Oプローブの間だけでなく、HIV1-O単位複製配列とHIV1-Mプローブの間でも交差ハイブリダイゼーション形成は生じない。

## 【0270】

従って、本発明によるH I V 1-MおよびH I V 1-Oプライマーおよびプローブによって、リアルタイムの定量R T-P C R条件で、非常に高い特異性検出が可能になることが証明された。

## 【0271】

## 実施例3

## H I V 1-MおよびH I V 1-Oの数量化

この実施例では、本発明のプライマーおよびプローブにより、R T-P C RでH I V ウイルス負荷が数量化できるようになることが例示される。

## 【0272】

プライマーおよびプローブは以下の配列である。

## H I V 1-Mプライマー

## 【0273】

## 【表34】

フォワード: TTGGAGAGCAATGGCTAGTGA (H1B4f, 配列番号7)

リバーズ: TGTGTGCAATCTAGTTGCCATA (H1B10r, 配列番号16)

## 【0274】

## H I V 1-Mプローブ

## 【0275】

## 【表35】

ATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTC (配列番号110)

## 【0276】

## H I V 1-Oプライマー

## 【0277】

## 【表36】

フォワード: TTGGAGAGCACTAGCTAGTGA (H1B5f, 配列番号140)

リバーズ: TGTGTGCAATCTATTTGCCATA (H1B13r, 配列番号168)

## 【0278】

## H I V 1-Oプローブ

## 【0279】

## 【表37】

GAAATCATTGCTAGTTGTCCTAAATGTCATAT (配列番号190)

## 【0280】

本発明によれば、この場合は、5'の標的に無関係なアームとして"TGCGC"、および3'の標的に無関係なアームとして"GCCA"を用いて、各プローブは分子ビーコンとして生成される（両アームに下線を引く）。5'アームをFAMフルオロフォアで標識し、3'アームをDark Quencherで標識する。

## 【0281】

従って、プローブ配列は以下の通りである（ビーコンアームを下線で示す）。

## 分子ビーコン型式のH I V 1-Mプローブ

## 【0282】

## 【表38】

FAM-TGCGCATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCGCGCA-DQ

(SH1BM5, 配列番号119)

## 【0283】

10

20

30

40

50

分子ビーコン型式のH I V 1 - O プローブ

【0284】

【表39】

FAM-TGCGCGAAATCATTGCTAGTTGTCCTAAATGTCATATGCGCA-DQ

(SH1BO2, 配列番号191)

【0285】

R T - P C R 手順の詳細は以下の通りである。

- パネル：
- B B I パフォーマンスパネル参照符号 P R D 3 0 1 (1 m l 当たり約  $10^5$  コピーの割合で、ヒト血漿に希釈したH I V 1 - O 培養物、試料番号の型式は3 0 1 - x x であり、x x は試料番号である) を代表的なH I V 1 - O パネルとして使用する； 10
- B B I パフォーマンスパネル参照符号 P R D 2 0 1 (1 m l 当たり約  $10^5$  コピーの割合で、ヒト血漿に希釈したH I V 1 - M 培養物、試料番号の型式は2 0 1 - y y であり、y y は試料番号である) が代表的なH I V 1 - M パネルとして使用され、H I V 1 - M サブタイプの数個の異なる遺伝子型に相当する；
- B B I Accurun 315 パネルシリーズ 5 0 0 (サブタイプ B) を基準パネルとして使用して基準となる検量線を得るが、この検量線はその対応する C t に対する公知の標的濃度のログをプロットすることによって構築する。次いで、未知の試料の濃度は、検量線に対してその対応する C t をマッピングすることによって決定する； 20
- 負の対照：H I V 1 陰性血漿；
- 抽出：キット Qiagen QiaAmp Viral RNA (参照番号 5 2 9 0 4) を製造業者の指示書に従い使用 (抽出する試料の量：1 4 0  $\mu$  L) ；
- プライマー対：H I V 1 - O プライマー対 (配列番号 7、8) および H I V 1 - M プライマー対 (配列番号 1、2) は一反応につきそれぞれ 0. 6  $\mu$  M で使用される；
- プローブ：F A M - Dark Quencher プローブ (配列番号 4、1 0)、一反応につき各 0. 2  $\mu$  M ；
- R T - P C R 試薬：R N A s e 不含水、および Qiagen QuantiTect Probe R T - P C R キット (Qiagen 参照番号：2 0 4 4 4 3)。製造業者の使用説明書に従う、[M g C l<sub>2</sub>] 4 m M ； 30
- 装置：IQ-Cycler Bio-Rad、
- 温度サイクリング：
  - 4 2 ° C で 3 0 ' (R T ステップ)、
  - 9 5 ° C で 1 5 ' (ポリメラーゼ活性化ステップ)、
  - (9 4 ° C で 1 5 " - 5 5 ° C で 3 0 " - 7 2 ° C で 3 0 ")  $\times$  5 0、
  - + 4 ° C。

【0286】

二連続の増幅実験を本発明のプライマーおよびプローブで実施する。

- a) 一对のプライマーおよびプローブ (H I V 1 - M プライマー対 (H 1 B 4 f、H 1 B 1 0 r、配列番号 7、1 6) および H I V 1 - M プローブ (S H 1 B M 5、配列番号 1 1 9) を用いての R T - P C R 40
- b) 両プライマー対および両プローブを用いての R T - P C R (H I V 1 - M プライマー対 (H 1 B 4 f、H 1 B 1 0 r、配列番号 7、1 6) + H I V 1 - O プライマー対 (H 1 B 5 f、H 1 B 1 3 r、配列番号 1 4 0、1 6 8) および H I V 1 - M プローブ (S H 1 B M 5、配列番号 1 1 9) + H I V 1 - O プローブ (S H 1 B O 2、配列番号 1 9 1) ) 。

【0287】

検量線に対してその対応する C t をマッピングすることによって、各アッセイの C t 結果をパネル P R D 2 0 1 および P R D 3 0 1 の数量化に使用する。各純粋な試料中の R N A コピー数 / m l に相当する数量化の値を製造業者の指示書に従って使用した市販のキッ 50

トと比較する。Roche社製キットAmplicor HIV1 Monitor Version 1.5 (ref.87674)、Bayer社製キットQuantiplex HIV1 RNA 3.0 bDNA (ref.6147)、およびOrganon Teknica社製キットNuclisens HIV-1 QT (ref.84152)。

【0288】

代表的な結果を表5および6に示す。

表5（実験a）：HIV1-M試料パネルで一对のプライマー（HIV1-Mプライマー対、H1B4f、H1B10r、配列番号7、16）および単一プローブ（HIV1-Mビーコンプローブ、配列番号119）を用いて得られた結果

【0289】

【表40】

10

| 試料    | 遺伝子型 | 結果、1ml当たりコピー      |                     |                      |      |          |
|-------|------|-------------------|---------------------|----------------------|------|----------|
|       |      | Roche<br>Amplicor | Bayer<br>Quantiplex | Organon<br>Nuclisens | 発明   |          |
|       |      |                   |                     |                      | CT   | Avg.     |
| 201-1 | A    | 4.00E+03          | 3.00E+03            | 2.00E+03             | 37.8 | 2.80E+03 |
| 201-2 | B    | 2.00E+05          | 8.00E+04            | 2.00E+05             | 29.2 | 4.30E+04 |
| 201-3 | C    | 2.00E+03          | 5.00E+03            | 1.00E+04             | 36.8 | 3.90E+03 |
| 201-4 | D    | 2.00E+05          | 1.00E+05            | 3.00E+05             | 30.9 | 2.50E+04 |
| 201-5 | E    | 2.00E+05          | 9.00E+04            | 6.00E+04             | 33.9 | 9.80E+03 |
| 201-6 | F    | 5.00E+05          | 9.00E+04            | 2.00E+05             | 28.7 | 5.00E+04 |
| 201-7 | G    | 5.00E+05          | 8.00E+04            | 1.00E+05             | 32.3 | 1.60E+04 |
| 201-8 | H    | 2.00E+05          | 3.00E+04            | 9.00E+04             | 34.7 | 7.60E+03 |
| 201-9 | 希釈剤  | ND                | ND                  | ND                   | N/A  |          |

20

【0290】

本発明のHIV1-Mプライマーおよびプローブによって、全てのHIV1-M遺伝子型を正確にリアルタイムで定量検出し、市販のキットとの良好な相関が得られるようになるのは、これらの結果から明らかである。

30

【0291】

表6（実験b）：HIV1-O試料パネルにおいて、HIV1-MとHIV1-Oプライマー（H1B4f、H1B10r、H1B5f、H1B13r、配列番号7、16、140、168）およびHIV1-MとHIV1-Oプローブ（配列番号119、191）を用いて得られた結果

【0292】

【表41】

| 試料    | 遺伝子型 | 結果、1ml当たりコピー      |                     |                      |      |          |
|-------|------|-------------------|---------------------|----------------------|------|----------|
|       |      | Roche<br>Amplicor | Bayer<br>Quantiplex | Organon<br>Nuclisens | 発明   |          |
|       |      |                   |                     |                      | CT   | Avg.     |
| 301-1 | O    | ND                | 3.00E+02            | < LDL                | 32.1 | 1.60E+04 |
| 301-2 | O    | ND                | 2.00E+03            | < LDL                | 32.9 | 1.00E+04 |
| 301-3 | O    | ND                | 8.00E+02            | < LDL                | 31   | 1.40E+04 |
| 301-4 | O    | ND                | 3.00E+02            | < LDL                | 35.7 | 2.00E+03 |
| 301-5 | 希釈剤  | ND                | ND                  | ND                   | N/A  |          |

40

【0293】

50

H I V 1 - O パネルで本発明の H I V 1 - M と H I V 1 - O プライマーおよびプローブを用いてより高レベルに数量化できることが表 6 から分かる。( < L D L = 低検出限界未満 )。

【 0 2 9 4 】

実施例 4

H I V 1 / H I V 2 マルチプレックスアッセイ ( 図 5 A および 5 B )

本実施例は、本発明の H I V 1 と H I V 2 プライマーおよびプローブが、H I V 1 または H I V 2 シグナル用マルチプレックスアッセイに使用できることを示す。本実施例はまた、異なる 2 つのフルオロフォア ( F A M および R O X ) の使用によって、同じ試験管内の 2 つの標的の蛍光を追跡できるようになることを実証する。

10

【 0 2 9 5 】

プライマーおよびプローブは以下の配列を有する。

H I V 1 - M プライマー

【 0 2 9 6 】

【 表 4 2 】

フォワード: TTGGAGAGCAATGGCTAGTGA (H1B4f, 配列番号 7)

リバーズ: TGTGTGCAATCTAGTTGCCATA (H1B10r, 配列番号 16)

【 0 2 9 7 】

H I V 1 - M プローブ

20

【 0 2 9 8 】

【 表 4 3 】

ATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTC (配列番号 110)

【 0 2 9 9 】

H I V 2 フォワードプライマー ( H 2 A 3 f 、 配列番号 1 9 5 )

【 0 3 0 0 】

【 表 4 4 】

AGGAAGRCARACAGCACTCTTC

30

【 0 3 0 1 】

ただし R = A / G ( T m = 6 6 ° C )

H I V 2 リバーズプライマー ( H 2 A 3 r 、 配列番号 2 5 0 )

【 0 3 0 2 】

【 表 4 5 】

GGTACTCCRAAGGGGTTTGTCTAT

【 0 3 0 3 】

ただし R = A / G ( T m = 6 5 ° C )

H I V 2 - A プローブ ( H I V 2 - A プローブ、 配列番号 2 9 7 )

40

【 0 3 0 4 】

【 表 4 6 】

GGCCAATAACACACTTGACACACA

【 0 3 0 5 】

本発明によれば、この場合、各プローブは、5' の標的に無関係のアームとして " C G C G C "、および 3' の標的に無関係なアームとして " G C G C G " ( 両アームに下線を引く ) を用いて、分子ビーコンとして生成される。5' アームを F A M または R O X フルオロフォアで標識し、3' アームを D a b c y l 部分で標識する。

【 0 3 0 6 】

50

従って、プローブ配列は以下の通りである（ビーコンアームを下線で示す）。  
分子ビーコン型式のH I V 1－Mプローブ

【0307】

【表47】

FAM-CGCGCATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCGCGCG-Dabcyl

【0308】

（SH1BM10、配列番号128）

分子ビーコン型式のH I V 2－Aプローブ

【0309】

【表48】

ROX - CGCGCGGCCAATAACACACTTGCACACAGCGCG - Dabcyl

【0310】

（H I V 2－Aビーコンプローブ、SH2A14a、配列番号299）

【0311】

RT-PCR手順の詳細は以下の通りである。

－ H I V 2－A陽性試料：感染患者から入手（Centre Hospitalier Bichat, Laboratory of Virology, Assistance Publique - Hopitaux de Paris, フランス）；

－ BBI Accurun 315パネルシリーズ500（サブタイプB）；

－ 負の対照：H I V 1およびH I V 2陰性試料；

－ 抽出：製造業者の指示に従って使用されるキットQiagen QiaAmp Viral RNA（参照符号52904）（抽出する試料の量：140 μL）；

－ プライマー対：H I V 1－Mプライマー対（配列番号7、16）およびH I V 2プライマー対（配列番号195、250）を、それぞれ、H I V 1－Mには一反応につき各0.5 μM、そしてH I V 2には一反応につき各0.3 μM使用した；

－ プローブ：H I V 1－M FAM-D a b c y l プローブ（配列番号128）およびH I V 2－A ROX D a b c y l プローブ（配列番号299）、一反応につき各0.4 μM；

－ RT-PCR試薬：RNAse 不含水、およびQiagen QuantiTect Probe RT-PCR Rキット（Qiagen参照符号：204443）、製造業者の使用説明書に従う、[MgCl<sub>2</sub>] 4mM；

－ 装置：IQ-Cycler Bio-Rad；

－ 温度サイクリング：

42 °Cで30'（RTステップ）、

95 °Cで15'（ポリメラーゼ活性化ステップ）、

（94 °Cで15"－55 °Cで30"－72 °Cで30"）×50、

+4 °C。

【0312】

本発明のプライマーおよびプローブを用いて二連続の増幅実験を実施した。

a) H I V 1－M標的濃度範囲で、一対のプライマーおよびプローブH I V 1－M（H1B4f、H1B10r、SH1BM10、配列番号7、16、119、一対のプライマーおよびプローブH I V 2（H2A3f、H2A3r、SH2A14a、配列番号195、250、299）を用いるRT-PCR；

b) H I V 2標的希釈範囲で、一対のプライマーおよびプローブH I V 1－M（H1B4f、H1B10r、SH1BM10、配列番号7、16、119）、一対のプライマーおよびプローブH I V 2（H2A3f、H2A3r、SH2A14a、配列番号195、250、299）を用いるRT-PCR。

【0313】

結果の解釈：各アッセイでは、増幅の初期サイクルで測定した蛍光のバックグラウンド

10

20

30

40

50

レベルより著しく上と考えられる蛍光レベルである閾値サイクル（Ct）が決定される。Ct値は標的濃度に反比例する。つまり、Ctが下がるほど標的濃度は上がる。

#### 【0314】

下表では、CT＝閾値サイクル；RFU<sub>max</sub>＝PCR実施の最後で観察された最大相対蛍光単位；CTL－＝負の対照；N/A＝蛍光レベルがバックグラウンドレベルより低い試料；Avg＝平均；cop＝コピー。

#### 【0315】

例示的Ct結果を表7に示す。

#### 【0316】

#### 【表49】

| HIV1-M       |      |      |      | HIV2-A       |      |      |      |
|--------------|------|------|------|--------------|------|------|------|
| コピー数<br>／PCR | CT   | CT   | Avg  | 希釈           | CT   | CT   | Avg  |
| 10000        | 28.2 | 28.2 | 28.2 | 1/300        | 28.0 | 27.7 | 27.9 |
| 1000         | 31.6 | 31.3 | 31.5 | 1/3000       | 31.9 | 32.4 | 32.2 |
| 100          | 35.7 | 35.7 | 35.7 | 1/30000      | 36.6 | 36.7 | 36.7 |
| 10           | 39.4 | N/A  | 39.4 | 1/300000     | 40.7 | N/A  | 40.7 |
| CTL -<br>(水) | N/A  | N/A  |      | CTL -<br>(水) | N/A  | N/A  |      |

#### 【0317】

本発明のHIV1とHIV2プライマーおよびプローブがHIV1-MまたはHIV2標的を検出するためのマルチプレックスアッセイで使用できることはこれらの結果から明らかである。

#### 【0318】

図5Aおよび5Bにより結果を例示する（ここでは実験を二重で実施したので各希釈に対し2つの曲線がある）。

#### 【0319】

#### 実施例5

HIV2／ICマルチプレックスアッセイ（図6Aおよび6B）

本実施例は、HIV2標的および内部標準（IC）は、HIV2シグナルのいかなる混乱もなく、本発明のHIV2プライマーとプローブ、および選択したICプライマーとプローブを使用し共増幅することができることを示す。本実施例はまた、異なる2つのフルオロフォア（ROXおよびTAMRA）の使用によって、同じ試験管内の2つの標的の蛍光を追跡できることを実証する。

#### 【0320】

本実施例では、一対のHIV2プライマーおよび一つのHIV2プローブの使用が関与する。これらのプライマーおよびプローブは、HIV2分離体の147bp配列を標的にする。それらは以下の配列を有する。

#### 【0321】

HIV2フォワードプライマー（H2A3f、配列番号195）

#### 【0322】

#### 【表50】

AGGAAGRCARACAGCACTCTTC

#### 【0323】

ただし  $R = A / G$  ( $T_m = 66^\circ\text{C}$ )

H I V 2 リバースプライマー (H 2 A 3 r、配列番号 2 5 0) :

【0 3 2 4】

【表 5 1】

GGTACTCCRAAGGGGTTTGTCTAT

【0 3 2 5】

ただし  $R = A / G$  ( $T_m = 65^\circ\text{C}$ )

H I V 2 - A プローブ (H I V 2 - A プローブ、配列番号 2 9 7) :

【0 3 2 6】

【表 5 2】

GGCCAATAACACACTTGCACACA

【0 3 2 7】

本実施例はまた、H I V 標的と同じサイズの増幅したフラグメントおよび G C % を得るために選択した、一对の I C プライマーおよび一つの I C プローブを使用することが関与する。

【0 3 2 8】

これらのプローブのそれぞれを本実施例で分子ビーコンとして使用する。H I V 2 プローブ各末端に付加された、標的に無関係なビーコンアームを下線で示す (R O X = フルオロフォア、D a b c y l = クエンチャー)。

【0 3 2 9】

分子ビーコン型式の H I V 2 - A プローブ (H I V 2 - A ビーコンプローブ、S H 2 A 1 4 a、配列番号 2 9 9)

【0 3 3 0】

【表 5 3】

ROX - CGCGCGGCCAATAACACACTTGCACACAGCGCG - Dabcyl

【0 3 3 1】

I C プローブには、フルオロフォアとして T A M R A、そしてクエンチャーとして D a b c y l が選択された。

【0 3 3 2】

二連続のリアルタイムでの定量増幅実験を実施した。

a) H I V 2 標的のみの添加による、H I V 2 プライマー対 + H I V 2 - A ビーコンプローブ (H 2 A 3 f、H 2 A 3 r、S H 2 A 9 a、配列番号 1 9 5、2 5 0、2 9 9) + I C プライマー対 + I C ビーコンプローブ ;

b) H I V 2 標的および I C の添加による、H I V 2 プライマー対 + H I V 2 - A ビーコンプローブ (H 2 A 3 f、H 2 A 3 r、S H 2 A 9 a、配列番号 1 9 5、2 5 0、2 9 9) + I C プライマー対 + I C ビーコンプローブ。

【0 3 3 3】

手順の詳細は以下の通りである。

— H I V 2 - A 陽性試料 : 感染患者から入手 (Centre Hospitalier Bichat, Laboratory of Virology, Assistance Publique - Hopitaux de Paris, フランス) ;

— I C 希釈 :  $10^6$  コピー / P C R を得るために I C を希釈する ;

— 負の対照 : H I V 2 陰性血漿 ;

— 核酸抽出 : キット Qiagen QiaAmp Viral RNA (参照符号 5 2 9 0 4) を製造業者の指示書に従い使用 (抽出する試料の量 =  $140 \mu\text{L}$ ) ;

— プライマー対 : 一反応につき各  $0.3 \mu\text{M}$  (配列番号 1 1、1 2 および I C プライマー) ;

— プローブ : 上記 H I V 2 - A R o x - D a b c y l ビーコンプローブ (配列番号 2

10

20

30

40

50

99) および I C T a m r a - D a b c y l ビーコンプローブ、一反応につき各 0, 4  $\mu$ M ;

— R T - P C R 試薬 : R N A s e 不含水、および Qiagen QuantiTect Probe R T - P C R キット (Qiagen 参照符号 : 2 0 4 4 4 3) を製造業者の指示書に従い使用、[M g C l<sub>2</sub>] = 4 m M ;

— 装置 : IQ-Cycler Bio-Rad ;

— 温度サイクリング :

42 ° C で 30 ' (R T ステップ)、  
95 ° C で 15 ' (ポリメラーゼ活性化ステップ)、  
(94 ° C で 30 " - 55 ° C で 30 " - 72 ° C で 30 ") × 50、  
+ 4 ° C。

10

#### 【0334】

H I V 2 - A 陽性試料を核酸抽出にかけ、水で 1 / 300、1 / 3000 および 1 / 30000 に希釈した後、実験 a) および b) に記載した R T - P C R 増幅にかけた。

#### 【0335】

I C 希釈物は、実験 b) に記載した R T - P C R 増幅 (およそ 10<sup>6</sup> c o p / P C R) にかけた。(c o p = コピー)。

#### 【0336】

結果の解釈 : 各アッセイでは、増幅の初期サイクルで測定した蛍光のバックグラウンドレベルより著しく上と考えられる蛍光レベルである閾値サイクル (C t) が決定される。C t 値は標的濃度に反比例する。つまり、C t が下がるほど標的濃度は上がる。

20

#### 【0337】

下表では、C T = 閾値サイクル ; 最高 R F U = P C R 実施の最後で観察された最大相対蛍光単位 ; C T L - = 負の対照、N / A = 蛍光レベルがバックグラウンドレベルより低い試料。

#### 【0338】

表 8 : 実験 a) および b) で、R O X の蛍光が読み取れた場合 (H I V 2 シグナル)、H I V 2 プライマー対 + H I V 2 - A ビーコンプローブ + I C プライマー対 + I C ビーコンプローブ (H I V 2 に対して H 2 A 3 f、H 2 A 3 r、S H 2 A 1 4 a、配列番号 195、250、299) を用いて得られた C T 値

30

#### 【0339】

#### 【表 54】

| アッセイ<br>条件                      | HIV2-A 1/300 |      |      |             | HIV2-A 1/3000 |      |      |             | HIV2-A 1/30000 |      |      |             |
|---------------------------------|--------------|------|------|-------------|---------------|------|------|-------------|----------------|------|------|-------------|
|                                 | CT           | CT   | CT   | Avg         | CT            | CT   | CT   | Avg         | CT             | CT   | CT   | Avg         |
| Exp. a) :<br>HIV2<br>標的         | 25.3         | 25.4 | 25.7 | <b>25.5</b> | 28.8          | 28.2 | 28.8 | <b>28.6</b> | 32.3           | 33.0 | 32.7 | <b>32.7</b> |
| Exp. b) :<br>HIV2<br>標的 +<br>IC | 25.4         | 25.3 | 25.4 | <b>25.4</b> | 29.0          | 20.3 | 28.7 | <b>29.0</b> | 33.0           | 34.1 | 34.8 | <b>34.0</b> |

40

#### 【0340】

試験した H I V 2 - A 抽出試料の希釈 (1 / 300、1 / 3000、1 / 30000) に関わりなく、H I V 2 の C t 値は I C の添加によって変化しなかったことがこの表から知ることができる。

#### 【0341】

50

表9：実験b)で、TAMRAの蛍光（ICシグナル）が読み取れた場合、HIV2プライマー対+HIV2-Aビーコンプローブ+ICプライマー対+ICビーコンプローブ（HIV2に対してH2A3f、H2A3r、SH2A14a、配列番号195、250、299）を用いて得られたCT値

【0342】

【表55】

| アッセイ<br>条件 | IC           |      |      |      |               |      |      |      |                |      |      |      |
|------------|--------------|------|------|------|---------------|------|------|------|----------------|------|------|------|
|            | HIV2-A 1/300 |      |      |      | HIV2-A 1/3000 |      |      |      | HIV2-A 1/30000 |      |      |      |
|            | CT           | CT   | CT   | Avg  | CT            | CT   | CT   | Avg  | CT             | CT   | CT   | Avg  |
| Exp. b):   | 28.5         | 28.7 | 28.7 | 28.6 | 27.2          | 27.7 | 28.0 | 27.6 | 27.7           | 27.7 | 27.7 | 27.7 |
| IC +       |              |      |      |      |               |      |      |      |                |      |      |      |
| HIV2       |              |      |      |      |               |      |      |      |                |      |      |      |
| 標的         |              |      |      |      |               |      |      |      |                |      |      |      |

10

【0343】

添加したHIV2-A抽出試料の希釈に関わりなく、ICのCt値が非常に再現性が高いことはこの表から知ることができる。

20

【0344】

これらの結果を図6A、6Bおよび6Cによって示す（図6Aおよび6Bにおいて、HIV2-Aの各希釈に対して、実験がここでは三重に実施されたため3本の曲線がある。負の対象に対して6本の曲線がある。図6Cにおいては、ICに対しては9本のカーブがあり、全ては同じ濃度であった）。

【図面の簡単な説明】

【0345】

【図1A】本発明によるHIV2-AおよびHIV2-Bの検出を例示する図である（実施例1を参照）。

【図1B】本発明によるHIV2-AおよびHIV2-Bの検出を例示する図である（実施例1を参照）。

30

【図2A】本発明によるHIV2-AおよびHIV2-Bの検出を例示する図である（実施例1を参照）。

【図2B】本発明によるHIV2-AおよびHIV2-Bの検出を例示する図である（実施例1を参照）。

【図3】本発明によるHIV2-AおよびHIV2-Bの検出を例示する図である（実施例1を参照）。

【図4A】本発明によるHIV1-MおよびHIV1-Oの検出を例示する図である（実施例2を参照）。

【図4B】本発明によるHIV1-MおよびHIV1-Oの検出を例示する図である（実施例2を参照）。

40

【図5A】本発明によるHIV1/HIV2マルチプレックス検出を例示する図である（実施例4を参照）。

【図5B】本発明によるHIV1/HIV2マルチプレックス検出を例示する図である（実施例4を参照）。

【図6A】本発明によるHIV2/内部標準アッセイを例示する図である（実施例5を参照）。

【図6B】本発明によるHIV2/内部標準アッセイを例示する図である（実施例5を参照）。

【図6C】本発明によるHIV2/内部標準アッセイを例示する図である（実施例5を参

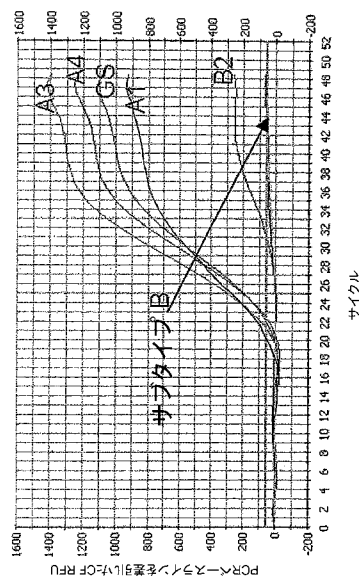
50

照)。

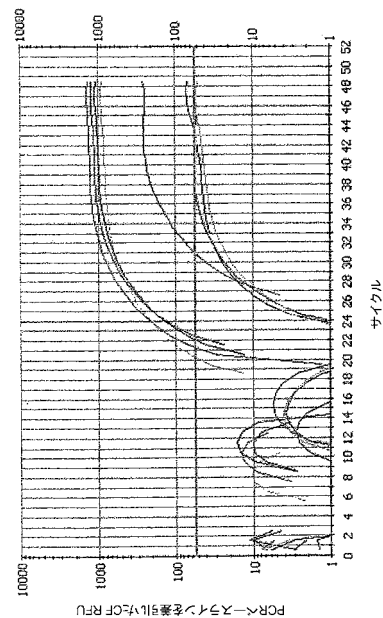
- 【図 7】本発明に記載の配列を例示する図である。  
 【図 8】本発明に記載の配列を例示する図である。  
 【図 9】本発明に記載の配列を例示する図である。  
 【図 10】本発明に記載の配列を例示する図である。  
 【図 11】本発明に記載の配列を例示する図である。  
 【図 12】本発明に記載の配列を例示する図である。  
 【図 13】本発明に記載の配列を例示する図である。  
 【図 14】本発明に記載の配列を例示する図である。  
 【図 15】本発明に記載の配列を例示する図である。  
 【図 16】本発明に記載の配列を例示する図である。  
 【図 17】本発明に記載の配列を例示する図である。  
 【図 18】本発明に記載の配列を例示する図である。  
 【図 19】本発明に記載の配列を例示する図である。  
 【図 20】本発明に記載の配列を例示する図である。  
 【図 21】本発明に記載の配列を例示する図である。

10

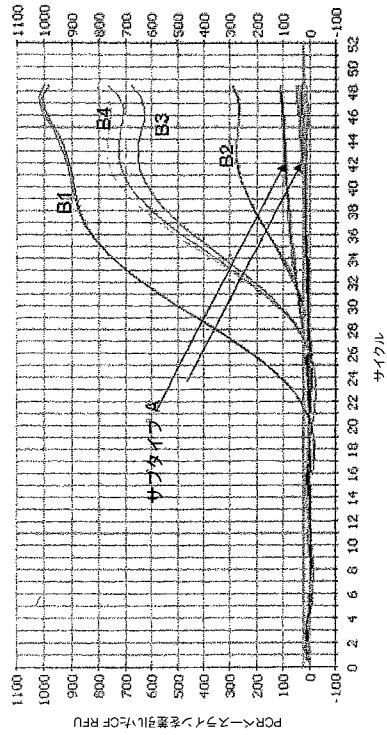
【図 1 A】



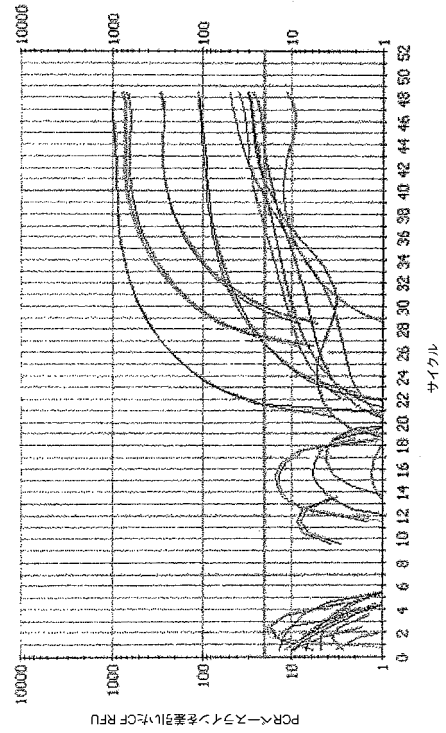
【図 1 B】



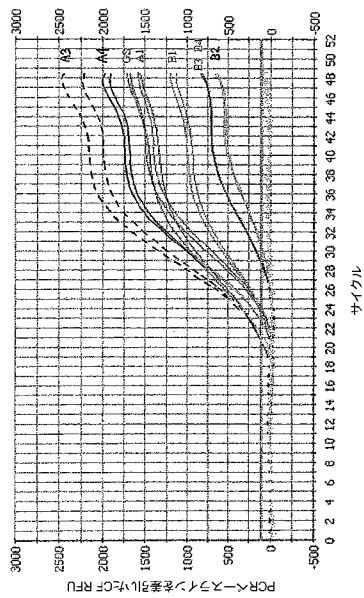
【図 2 A】



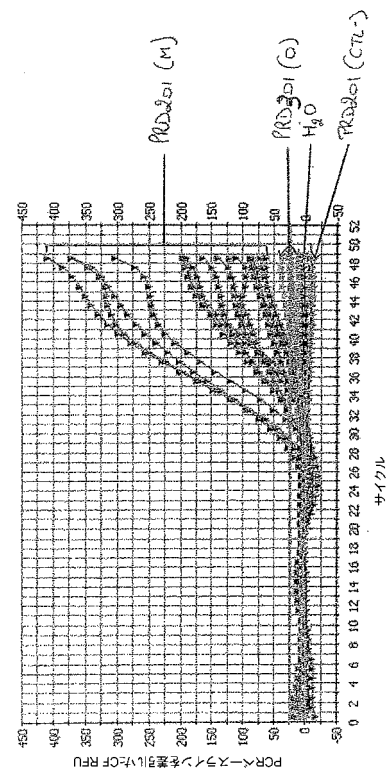
【図 2 B】



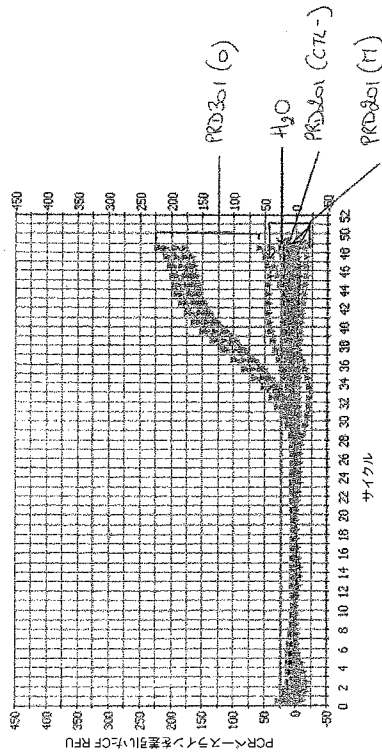
【図 3】



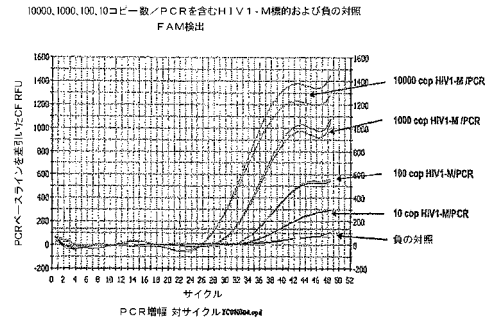
【図 4 A】



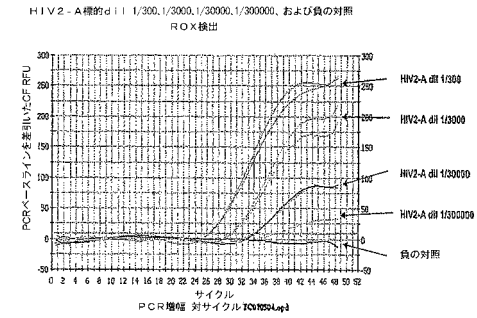
【図 4 B】



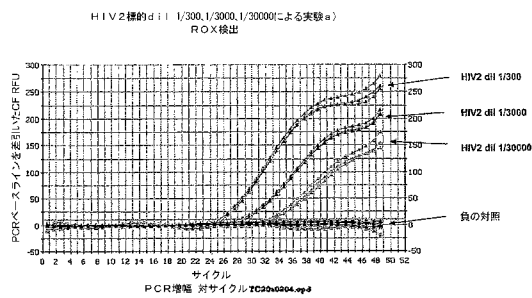
【図 5 A】



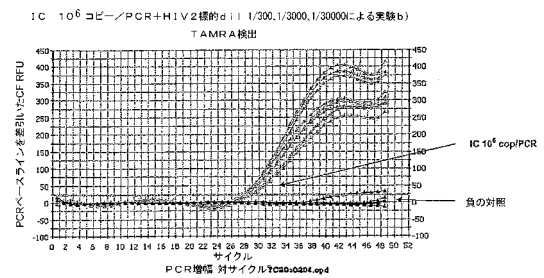
【図 5 B】



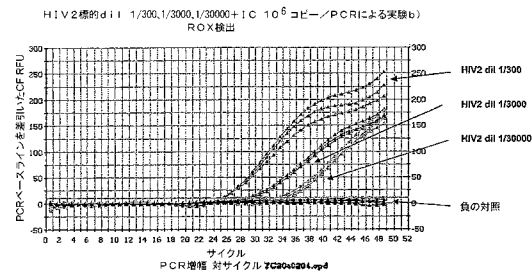
【図 6 A】



【図 6 C】



【図 6 B】



【図 7-1】

| 配列番号 | 名称 | 5'から3'の配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 対する11の機能      | コメント | 位置          |
|------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------|-------------|
| 1    |    | gaagc aatgacacaa gtagatgaat tatgacatgc ttgacatgcagc aagatgcact<br>tttagatgc aatgacagc gccacacagc aaatgacaa ataatgcagc aatgacagc<br>caatgcctgc ttatttacc ctgcacatgc ttatgcacaa aataatgacaa gccatgcctg<br>aaatgcac ttacaaagaa gaagcagcagc atgcacagc agatgcctgc ctgcagatcat<br>gaagcagcagc ttgcacatc ttgcagc                                                                            | HIV1-O 単位複製配列 |      | 4176 - 4438 |
| 2    |    | aattgcagc aatgcctgc ttatttacc ctgcacatgc ttatgcacaa aataatgacaa<br>gccatgcctgc ataatgcac ttacaaagaa gaagcagcagc atgcacagc agatgcctgc<br>ctgcagatcat gaagcagcagc ttgcacatc ttgcagc                                                                                                                                                                                                    | HIV1-O 単位複製配列 |      | 4291 - 4436 |
| 3    |    | gaagcagatc aaataatgac aaatgcac ttacaaagaa gaagcagcagc ttgcacatc<br>gaagcagatc accgcagcagc agatgcacatc gaataatgc atgagatgc ctgcctgcac<br>gaagcagatc ttgcacatc ttgcagc ttatgcacaa aataatgacaa gccatgcctgc<br>ttatttacc ctgcacatgc ttatgcacaa aataatgacaa gccatgcctgc ttatttacc<br>ctgcacatgc aatgcagcagc aatgcagc ttgcacatc ttgcagc                                                    | HIV1-O 単位複製配列 |      | 4231 - 4491 |
| 4    |    | aattgc aatgcacac gtagatgaat ttgcacac: accatgcctgc gccacacgaa<br>ttatgcctgc ctgcctgcac ttgcacaa agatgcagcagc aatgcagc ctgcagatcat<br>gccatgcac ttatgcacaa ttatgcacaa ttatgcacaa ttatgcacaa<br>a ttgcacacgagc atgcacatc ttatgcacaa                                                                                                                                                     | HIV1-O 単位複製配列 |      | 4336 - 4491 |
| 5    |    | ctgcagcagc ttgcctgcac aatgcacatc gccacacgagc atgcacacgac atgcacac<br>caagacagc atgcctgcac ttgcacacgagc ttgcacacgagc atgcacacgagc atgcacac<br>ttgcacacgagc gtagatgaat ttgcacacgagc ttgcacacgagc atgcacacgagc<br>ttatgcctgc aatgcagcagc atgcacacgagc atgcacacgagc atgcacacgagc<br>aaatgcac ttacaaagaa gaagcagcagc atgcacacgagc agatgcctgc ctgcagatcat<br>gaagcagcagc ttgcacatc ttgcagc | HIV2 単位複製配列   |      | 4889 - 5036 |
| 3015 |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | HIV1-O 単位複製配列 |      | 4176-4429   |

## 【図 8】

| 配列番号 | 名称    | 5'から3'への配列                 | 好ましい機能           | コメント | 位置        |
|------|-------|----------------------------|------------------|------|-----------|
| 6    | H1B1f | GGAGGGAATCAACATAGATGAA     | HIV-1M7P-2-5'UTR |      | 4176-4189 |
| 7    | H1B1f | TGGAGAGCAATGGCTATGA        | HIV-1M7P-2-5'UTR |      | 4383-4393 |
| 8    | H1B2f | TTGGAGAGCAATGGCTATGA       | HIV-1M7P-2-5'UTR |      | 4393-4393 |
| 9    | H1B2f | TTGGAGAGCAATGGCTATGA       | HIV-1M7P-2-5'UTR |      | 4393-4393 |
| 10   | H1B1f | AATGGAGAGCAATGGCTATGA      | HIV-1M7P-2-5'UTR | d    | 4393-4393 |
| 11   | H1B1f | AATGGAGAGCAATGGCTATGA      | HIV-1M7P-2-5'UTR |      | 4393-4393 |
| 12   | H1B1f | AATGGAGAGCAATGGCTATGA      | HIV-1M7P-2-5'UTR | g    | 4393-4393 |
| 13   | H1B1f | AATGGAGAGCAATGGCTATGA      | HIV-1M7P-2-5'UTR |      | 4393-4393 |
| 14   | H1B2f | TCATTAATGGAGAGCAATGGCTATGA | HIV-1M7P-2-5'UTR | g1   | 4391-4393 |
| 15   | H1B2f | TCATTAATGGAGAGCAATGGCTATGA | HIV-1M7P-2-5'UTR | g1   | 4391-4393 |

【図 7-2】

[illegible]

## 【図 9】

| 配列番号 | 名称     | 5'から3'への配列                 | 特異的機能       | コメント | 位置        |
|------|--------|----------------------------|-------------|------|-----------|
| 16   | H1810P | TGTGTGCAATCTAGTGGCAT       | HV1-M1ハスツリマ |      | 4429-4408 |
| 17   | H1832P | TGTGACATCTAATGGCAT         | HV1-M1ハスツリマ |      | 4429-4408 |
| 18   | H1833P | TGTGACATCTAGTGGCAT         | HV1-M1ハスツリマ |      | 4429-4408 |
| 19   |        | TGTGACATCTAATGGCAT         | HV1-M1ハスツリマ |      | 4429-4408 |
| 20   |        | TGTGACATCTAGTGGCAT         | HV1-M1ハスツリマ | d    | 4429-4408 |
| 21   |        | TGTGACATCTAATGGCAT         | HV1-M1ハスツリマ |      | 4429-4408 |
| 22   |        | TGTGACATCTAGTGGCAT         | HV1-M1ハスツリマ | d    | 4429-4408 |
| 23   |        | TGTGACATCTAATGGCAT         | HV1-M1ハスツリマ | d    | 4429-4408 |
| 24   |        | TGTGACATCTAGTGGCAT         | HV1-M1ハスツリマ | d    | 4429-4408 |
| 25   | H1816P | ATGTGACATCTAGTGGCAT        | HV1-M1ハスツリマ | e    | 4431-4408 |
| 26   | H1819P | TCTGAA GTGTGACATCTAGTGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | e    | 4436-4408 |
| 27   | H1820P | TCTGAA GTGTGACATCTAGTGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | e    | 4436-4408 |
| 28   |        | TCTGAA GTGTGACATCTAGTGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | e    | 4436-4408 |
| 29   |        | TCTGAA GTGTGACATCTAGTGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | e    | 4436-4408 |
| 30   |        | TCTGAA GTGTGACATCTAGTGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | d,e  | 4436-4408 |
| 31   |        | TCTGAA GTGTGACATCTAGTGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | d,e  | 4436-4408 |
| 32   |        | TCTGAA GTGTGACATCTAGTGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | d,e  | 4436-4408 |
| 33   |        | TCTGAA GTGTGACATCTAGTGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | d,e  | 4436-4408 |
| 34   |        | TCTGAA GTGTGACATCTAGTGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | d,e  | 4436-4408 |
| 35   |        | TCTGAA GTGTGACATCTAGTGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | e    | 4436-4408 |
| 36   |        | TCTGAA GTGTGACATCTAGTGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | e    | 4436-4408 |
| 37   |        | TCTAGA GTGTGACATCTAATGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | e    | 4436-4408 |
| 38   |        | TCTAGA GTGTGACATCTAATGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | e    | 4436-4408 |
| 39   |        | TCTAGA GTGTGACATCTAGTGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | d,e  | 4436-4408 |
| 40   |        | TCTAGA GTGTGACATCTAGTGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | d,e  | 4436-4408 |
| 41   |        | TCTAGA GTGTGACATCTAATGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | d,e  | 4436-4408 |
| 42   |        | TCTAGA GTGTGACATCTAATGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | d,e  | 4436-4408 |
| 43   |        | TCTAGA GTGTGACATCTAATGGCAT | HV1-M1ハスツリマ | d,e  | 4436-4408 |

【図 10】

[illegible]

【図 1 1】

|    |           |      |           |            |        |           |
|----|-----------|------|-----------|------------|--------|-----------|
| 75 | TATGGCTTC | TARA | GGTGCATCA | TGATTCGCAT | d. 0.1 | 4438-4408 |
| 76 | TATGGCTTC | TARA | GGTGCATCA | TGATTCGCAT | d. 0.1 | 4438-4408 |
| 77 | TATGGCTTC | TARA | GGTGCATCA | TGATTCGCAT | d. 0.1 | 4438-4408 |
| 78 | TATGGCTTC | TARA | GGTGCATCA | TGATTCGCAT | d. 0.1 | 4438-4408 |
| 79 | TATGGCTTC | TARA | GGTGCATCA | TGATTCGCAT | d. 0.1 | 4438-4408 |
| 80 | TATGGCTTC | TARA | GGTGCATCA | TGATTCGCAT | d. 0.1 | 4438-4408 |
| 81 | TATGGCTTC | TARA | GGTGCATCA | TGATTCGCAT | d. 0.1 | 4438-4408 |
| 82 | TATGGCTTC | TARA | GGTGCATCA | TGATTCGCAT | d. 0.1 | 4438-4408 |

【図 1 2】

| 配列番号 | 名称     | 5 から 3 への配列                                | 変異した塩基      | コメント  | 位置          |
|------|--------|--------------------------------------------|-------------|-------|-------------|
| 83   |        | AAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTC            | HIV-1M フロ-7 | e     | 4329 - 4359 |
| 84   |        | AAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTC             | HIV-1M フロ-7 | e     | 4329 - 4359 |
| 85   |        | AAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTC             | HIV-1M フロ-7 | e     | 4329 - 4359 |
| 86   |        | AAAGAAATAGTAGCTAGCTGTGATAAATGTC            | HIV-1M フロ-7 | e     | 4329 - 4359 |
| 87   |        | AAAGAAATAGTAGCAGCTGTGATAAATGTC             | HIV-1M フロ-7 | e     | 4329 - 4359 |
| 88   |        | AAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTC             | HIV-1M フロ-7 | d,e   | 4329 - 4359 |
| 89   |        | AAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTC             | HIV-1M フロ-7 | d,e   | 4329 - 4359 |
| 90   |        | AAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTC             | HIV-1M フロ-7 | d,e   | 4329 - 4359 |
| 91   |        | AAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTC             | HIV-1M フロ-7 | d,e   | 4329 - 4359 |
| 92   | SH18M4 | TGGCAGCAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCGGCGA | HIV-1M フロ-7 | e,b   | 4329 - 4359 |
| 93   |        | TGGCAGCAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTCGGCGA  | HIV-1M フロ-7 | e,b   | 4329 - 4359 |
| 94   |        | TGGCAGCAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTCGGCGA  | HIV-1M フロ-7 | e,b   | 4329 - 4359 |
| 95   |        | TGGCAGCAAGAAATAGTAGCTAGCTGTGATAAATGTCGGCGA | HIV-1M フロ-7 | e,b   | 4329 - 4359 |
| 96   |        | TGGCAGCAAGAAATAGTAGCAGCTGTGATAAATGTCGGCGA  | HIV-1M フロ-7 | d,e,b | 4329 - 4359 |
| 97   |        | TGGCAGCAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTCGGCGA  | HIV-1M フロ-7 | d,e,b | 4329 - 4359 |
| 98   |        | TGGCAGCAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTCGGCGA  | HIV-1M フロ-7 | d,e,b | 4329 - 4359 |
| 99   |        | TGGCAGCAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTCGGCGA  | HIV-1M フロ-7 | d,e,b | 4329 - 4359 |
| 100  |        | TGGCAGCAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTCGGCGA  | HIV-1M フロ-7 | e,b   | 4329 - 4359 |
| 101  | SH18M2 | TGGCAGCAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTCGGCGG  | HIV-1M フロ-7 | e,b   | 4329 - 4359 |
| 102  |        | TGGCAGCAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTCGGCGG  | HIV-1M フロ-7 | e,b   | 4329 - 4359 |
| 103  |        | TGGCAGCAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTCGGCGG  | HIV-1M フロ-7 | e,b   | 4329 - 4359 |
| 104  |        | TGGCAGCAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTCGGCGG  | HIV-1M フロ-7 | e,b   | 4329 - 4359 |
| 105  |        | TGGCAGCAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTCGGCGG  | HIV-1M フロ-7 | d,e,b | 4329 - 4359 |
| 106  |        | TGGCAGCAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTCGGCGG  | HIV-1M フロ-7 | d,e,b | 4329 - 4359 |
| 107  |        | TGGCAGCAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTCGGCGG  | HIV-1M フロ-7 | d,e,b | 4329 - 4359 |
| 108  |        | TGGCAGCAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTCGGCGG  | HIV-1M フロ-7 | d,e,b | 4329 - 4359 |
| 109  |        | TGGCAGCAAGAAATAGTGGCAGCTGTGATAAATGTCGGCGG  | HIV-1M フロ-7 | d,e,b | 4329 - 4359 |

【图 1 3】

|     |                                      |         |  |             |           |
|-----|--------------------------------------|---------|--|-------------|-----------|
| 110 | ATATGACGACGCTGTGTGATAAATGTC          |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 111 | ATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTC          |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 112 | ATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTC          |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 113 | ATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTC          |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 114 | ATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTC          |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 115 | ATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTC          |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 116 | ATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTC          |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 117 | ATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTC          |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 118 | ATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTC          |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 119 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGA | SH1BM5  |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 120 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGA |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 121 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGA |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 122 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGA |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 123 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGA |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 124 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGA |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 125 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGA |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 126 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGA |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 127 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGA | SH1BM10 |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 128 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGA | SH1BM13 |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 129 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGG | SH1BM14 |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 130 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGG |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 131 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGG |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 132 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGG |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 133 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGG |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 134 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGG |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 135 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGG |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 136 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGG |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 137 | ATATGATGACGCTGTGTGATAAATGTC          |         |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |
| 138 | TGCGCATAGTACGACGCTGTGTGATAAATGTCGCGG | SH1BM15 |  | HIV-1M 7B-7 | 4335-4359 |

【図 1 4】

| 配列番号 | 名称     | 5'から3'への配列               | 特異性機能            | コメント | 位置        |
|------|--------|--------------------------|------------------|------|-----------|
| 139  | H1B3f  | GAAGAAATGAAAAATAGATAAA   | HIV1-O2pW-ドプライマー |      | 4231-4254 |
| 140  | H1B5f  | TTGGAGAGCACTAGCTAGTGA    | HIV1-O2pW-ドプライマー |      | 4338-4358 |
| 141  |        | TTGGAGAGCACTAGCTAGTGA    | HIV1-O2pW-ドプライマー |      | 4338-4358 |
| 142  |        | TTGGAAAGCACTAGCTAGTGA    | HIV1-O2pW-ドプライマー |      | 4338-4358 |
| 143  |        | TTGGAAAGCACTAGCTAGTGA    | HIV1-O2pW-ドプライマー |      | 4338-4358 |
| 144  |        | TTGGAGAGCACTAGCTAGTGA    | HIV1-O2pW-ドプライマー | d    | 4338-4358 |
| 145  |        | TTGGAAAGCACTAGCTAGTGA    | HIV1-O2pW-ドプライマー | d    | 4338-4358 |
| 146  |        | TTGGAAAGCACTAGCTAGTGA    | HIV1-O2pW-ドプライマー | d    | 4338-4358 |
| 147  |        | TTGGAGAGCACTAGCTAGTGA    | HIV1-O2pW-ドプライマー | d    | 4338-4358 |
| 148  |        | TTGGAGAGCACTAGCTAGTGA    | HIV1-O2pW-ドプライマー | d    | 4338-4358 |
| 149  | H1B15f | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | e    | 4338-4358 |
| 150  | H1B16f | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | e    | 4338-4358 |
| 151  | H1B17f | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | e    | 4338-4358 |
| 152  |        | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | e    | 4338-4358 |
| 153  |        | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | d,e  | 4338-4358 |
| 154  |        | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | d,e  | 4338-4358 |
| 155  |        | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | d,e  | 4338-4358 |
| 156  |        | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | d,e  | 4338-4358 |
| 157  |        | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | d,e  | 4338-4358 |
| 158  | H1B18f | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | e    | 4338-4358 |
| 159  |        | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | e    | 4338-4358 |
| 160  |        | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | e    | 4338-4358 |
| 161  |        | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | e    | 4338-4358 |
| 162  |        | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | e    | 4338-4358 |
| 163  |        | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | d,e  | 4338-4358 |
| 164  |        | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | d,e  | 4338-4358 |
| 165  |        | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | d,e  | 4338-4358 |
| 166  |        | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | d,e  | 4338-4358 |
| 167  |        | AAATTGGAGAGCACTAGCTAGTGA | HIV1-O2pW-ドプライマー | d,e  | 4338-4358 |

【図 1 5】

| 配列番号 | 名称     | 5'から3'への配列            | 特異性機能            | コメント | 位置        |
|------|--------|-----------------------|------------------|------|-----------|
| 168  | H1B13f | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー |      | 4484-4483 |
| 169  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー |      | 4484-4483 |
| 170  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー |      | 4484-4483 |
| 171  | H1B24f | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | e    | 4481-4483 |
| 172  | H1B25f | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | e    | 4481-4483 |
| 173  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | e    | 4481-4483 |
| 174  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | e    | 4481-4483 |
| 175  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | d,e  | 4481-4483 |
| 176  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | d,e  | 4481-4483 |
| 177  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | d,e  | 4481-4483 |
| 178  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | d,e  | 4481-4483 |
| 179  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | d,e  | 4481-4483 |
| 180  | H1B26f | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | e    | 4481-4483 |
| 181  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | e    | 4481-4483 |
| 182  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | e    | 4481-4483 |
| 183  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | e    | 4481-4483 |
| 184  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | e    | 4481-4483 |
| 185  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | d,e  | 4481-4483 |
| 186  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | d,e  | 4481-4483 |
| 187  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | d,e  | 4481-4483 |
| 188  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | d,e  | 4481-4483 |
| 189  |        | TGTTGCAATCTATTGGCCATA | HIV1-O1pW-スプライマー | d,e  | 4481-4483 |

【図 1 6】

| 配列番号 | 名称      | 5'から3'への配列                           | 特異性機能            | コメント | 位置        |
|------|---------|--------------------------------------|------------------|------|-----------|
| 190  |         | GAATATCAATTCCTAGTTGCTGTAATTCATAT     | HIV1-O2pW-ドプライマー |      | 4387-4417 |
| 191  | SH1B02  | TGGGCGGAATCAATTCCTAGTTGCTGTAATTCATAT | HIV1-O2pW-ドプライマー | b    | 4387-4417 |
| 192  | SH1B07  | CGGCGGGAATCAATTCCTAGTTGCTGTAATTCATAT | HIV1-O2pW-ドプライマー | b    | 4387-4417 |
| 193  |         | AGTCTACCTGAGCATGAATTCCTGCTGCTTTA     | HIV1-O2pW-ドプライマー |      | 4448-4417 |
| 194  | SH1B010 | CGGCGGGAATCAATTCCTAGTTGCTGTAATTCATAT | HIV1-O2pW-ドプライマー | b    | 4448-4417 |

【図 1 7】

| 配列番号 | 名称     | 5'から3'への配列            | 特異性機能           | コメント | 位置        |
|------|--------|-----------------------|-----------------|------|-----------|
| 195  | H2A3f  | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 196  | H2A8f  | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | c    | 4889-4813 |
| 197  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 198  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 199  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 200  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 201  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 202  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 203  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | c    | 4889-4813 |
| 204  | H2A10f | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 205  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 206  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 207  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 208  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 209  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 210  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 211  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 212  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 213  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 214  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 215  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 216  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 217  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 218  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 219  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 220  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 221  |        | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | d    | 4889-4813 |
| 222  | 539    | AGGAAGCAGACAGAGCTCTTC | HIV2-2pW-ドプライマー | e    | 4889-4813 |

【図 18】

|     |       |                             |               |   |           |
|-----|-------|-----------------------------|---------------|---|-----------|
| 223 | H2A1f | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 224 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | l | 4889-4913 |
| 225 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | l | 4889-4913 |
| 226 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | l | 4889-4913 |
| 227 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | l | 4889-4913 |
| 228 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 229 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 230 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 231 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 232 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 233 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | l | 4889-4913 |
| 234 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | l | 4889-4913 |
| 235 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | l | 4889-4913 |
| 236 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 237 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 238 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 239 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 240 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 241 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 242 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 243 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 244 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 245 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 246 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 247 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 248 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |
| 249 |       | GAAGAGAGGAAGGACACACAGCTCTTC | HV2-717-77517 | d | 4889-4913 |

【図 19】

| 配列番号 | 名称     | 5'から3'への配列              | 好ましい機能        | コメント | 位置        |
|------|--------|-------------------------|---------------|------|-----------|
| 250  | H2A3f  | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 251  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 252  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 253  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 254  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 255  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 256  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 257  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 258  | H2A8f  | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | c    | 5038-5014 |
| 259  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 260  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 261  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 262  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 263  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 264  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 265  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 266  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 267  | H2A9f  | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | c    | 5038-5014 |
| 268  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 269  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 270  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 271  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 272  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 273  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 274  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 275  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 276  |        | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d    | 5038-5014 |
| 277  | H2A10f | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | l    | 5038-5014 |

【図 20】

|     |        |                                |               |   |           |
|-----|--------|--------------------------------|---------------|---|-----------|
| 278 | n° 538 | GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT        | HV2-717-77517 | l | 5038-5014 |
| 279 | H2A7r  | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d | 5038-5014 |
| 280 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | l | 5038-5014 |
| 281 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d | 5038-5014 |
| 282 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d | 5038-5014 |
| 283 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | l | 5038-5014 |
| 284 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | l | 5038-5014 |
| 285 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d | 5038-5014 |
| 286 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d | 5038-5014 |
| 287 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d | 5038-5014 |
| 288 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d | 5038-5014 |
| 289 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d | 5038-5014 |
| 290 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | l | 5038-5014 |
| 291 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d | 5038-5014 |
| 292 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | l | 5038-5014 |
| 293 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | l | 5038-5014 |
| 294 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d | 5038-5014 |
| 295 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d | 5038-5014 |
| 296 |        | ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT | HV2-717-77517 | d | 5038-5014 |

【図 21】

| 配列番号 | 名称      | 5'から3'への配列                     | 好ましい機能      | コメント | 位置        |
|------|---------|--------------------------------|-------------|------|-----------|
| 297  |         | GGCCCAATACACACTTGCACACA        | HV2-A-700-7 |      | 4932-4956 |
| 298  | SH2Aa   | AGCGCGGCAATACACACTTGCACACGCGCT | HV2-A-700-7 | b    | 4932-4956 |
| 299  | SH2A14a | CGCGCGGCAATACACACTTGCACACGCGCT | HV2-A-700-7 | b    | 4932-4956 |
| 300  |         | GGCTATACACACTTGCACACA          | HV2-B-700-7 |      | 4933-4956 |
| 301  | SH2A1b  | AGCGCGGCTATACACACTTGCACACGCGCT | HV2-B-700-7 | b    | 4933-4956 |
| 302  | SH2A2b  | CGCGCGGCTATACACACTTGCACACGCGG  | HV2-B-700-7 | b    | 4933-4956 |
| 303  | SH2A3b  | CGCGCGGCTATACACACTTGCACACGCGG  | HV2-B-700-7 | b    | 4933-4956 |
| 304  | SH2A4b  | CGCGCGGCTATACACACTTGCACACGCGG  | HV2-B-700-7 | l    | 4932-4956 |

【配列表】

0004913042000001.app

---

フロントページの続き

- (72)発明者 ビロン, マリー-フィリップ  
フランス国、エフ-9 2 6 0 0 アニエール・シュール・セヌ、リュ・デュ・シャトー 5 3
- (72)発明者 オルヴェ, アラン  
フランス国、エフ-9 5 2 2 0 エルブレー、アレ・ドゥ・ラ・ベラーディエール 1 0

審査官 鳥居 敬司

- (56)参考文献 特表2 0 0 0-5 1 2 1 6 0 (JP, A)  
特表平0 8-5 0 8 4 0 4 (JP, A)  
欧州特許出願公開第0 1 0 4 3 4 0 7 (EP, A 1)  
国際公開第2 0 0 3/0 2 0 8 7 8 (WO, A 1)  
J. Virol. Method., 2000, Vol.89, p.97-108  
J. Virol. Method., 2000, Vol.88, p.81-87

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12N 15/09  
C12Q 1/68  
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDREAMII)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
WPI