

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5965846号
(P5965846)

(45) 発行日 平成28年8月10日(2016.8.10)

(24) 登録日 平成28年7月8日(2016.7.8)

(51) Int.Cl.

C 12 Q 1/68 (2006.01)
C 12 N 15/09 (2006.01)

F 1

C 12 Q 1/68
C 12 N 15/00Z N A A
A

請求項の数 11 (全 40 頁)

(21) 出願番号 特願2012-553988 (P2012-553988)
 (86) (22) 出願日 平成23年2月16日 (2011.2.16)
 (65) 公表番号 特表2013-519395 (P2013-519395A)
 (43) 公表日 平成25年5月30日 (2013.5.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/025046
 (87) 国際公開番号 WO2011/103159
 (87) 国際公開日 平成23年8月25日 (2011.8.25)
 審査請求日 平成26年2月14日 (2014.2.14)
 (31) 優先権主張番号 61/304,941
 (32) 優先日 平成22年2月16日 (2010.2.16)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 595117091
 ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニ
 BECTON, DICKINSON AND COMPANY
 アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー O
 7417-1880 フランクリン・レイクス ベクトン・ドライブ 1
 1 BECTON DRIVE, FRANKLIN LAKES, NEW JERSEY 07417-1880, UNITED STATES OF AMERICA
 (74) 代理人 110001243
 特許業務法人 谷・阿部特許事務所
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】近縁のヒトパピローマウイルス(HPV)の血清型を検出するためのアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生物学的試料におけるヒトパピローマウイルス(HPV)の複数の血清型の存在または非存在を検出するマルチプレックスアッセイであって、

前記マルチプレックスアッセイは、存在する検出のためのチャネルより多くの血清型を検出し、

前記マルチプレックスアッセイが、

生物学的試料を用意するステップと；

前記生物学的試料を少なくとも第1、第2及び第3の3つのオリゴヌクレオチドプライマー/プローブのセットと接触させるステップであって、

そのセットの各々が、

検出可能な形で標識され、ヌクレオチド配列の長さが10から26である少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプローブと、

それらの各々のヌクレオチド配列の長さが10から25である少なくとも2つのオリゴヌクレオチドプライマーと、を備え、

前記接触が、プローブおよびプライマーが標的配列にアニーリングするような条件下で行われ、

各プライマー/プローブのセットは、生物の特定の血清型に対して少なくとも優先的であり、

前記第1のプライマー/プローブのセット及び第2のプライマー/プローブのセットは

10

20

、互いにに対して縮重しており、

前記縮重プローブは各々、同じチャネルにおいて検出可能なシグナルを発するシグナル部分を有し、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、前記他の2つのプライマー／プローブのセットのいずれに対しても縮重しておらず、前記縮重プライマー／プローブのセットが優先的にアニーリングする血清型ではない第3の血清型を識別し、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、前記縮重プローブのシグナル部分により発せられる波長と同じまたは異なる波長のシグナルを発するシグナル部分を有し、

前記縮重プライマー／プローブのセットの前記標的は、配列番号36～38からなる群から選択される、ステップと；

存在する場合は、前記標的配列を増幅するステップと；

前記プローブセットの前記標的配列に対するハイブリダイゼーションの指標としての標識を検出のためにモニタリングし、これにより、HPVの血清型のうちの少なくとも1つの存在または非存在を示すステップと、

を含むことを特徴とするマルチプレックスアッセイ。

【請求項2】

請求項1に記載のマルチプレックスアッセイであって、

a)

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号36であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型51を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセット及び第2のプライマー／プローブのセットのいずれに対しても縮重しておらず、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、配列番号24～29、および配列番号24～29と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型39を選択し、HPV血清型68に対してHPV血清型39を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号1、3および5、ならびに配列番号1、3および5と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第2のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型68を選択し、HPV血清型39に対してHPV血清型68を識別せず、

前記第2のプライマー／プローブのセットは、配列番号2、4および6、ならびに配列番号2、4および6と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択されるマルチプレックスアッセイ、

または、

b)

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号37であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型59を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセット及び第2のプライマー／プローブのセットのいずれに対しても縮重しておらず、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、配列番号30～35、および配列番号30～35と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型33を選択し、HPV血清型58に対してHPV血清型33を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号7、9、11、13および15、ならびに配列番号7、9、11、13および15と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第2のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型58を選択し、HPV血清

10

20

30

40

50

型 3 3 に対して H P V 血清型 5 8 を識別せず、

前記第 2 のプライマー / プローブのセットは、配列番号 8、10、12、14 および 16、ならびに配列番号 8、10、12、14 および 16 と少なくとも 70 % 相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つから選択されるマルチプレックスアッセイ、

または

c)

前記縮重プライマー / プローブのセットの標的は、配列番号 3 8 であり、

前記第 3 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 5 9 を識別するように構成され、前記第 1 のプライマー / プローブのセット及び第 2 のプライマー / プローブのセットのいずれに対しても縮重しておらず、

前記第 3 のプライマー / プローブのセットは、配列番号 3 0 ~ 3 5、および配列番号 3 0 ~ 3 5 と少なくとも 70 % 相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つから選択され；

前記第 1 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 5 6 を選択し、H P V 血清型 5 6 に対して H P V 血清型 6 6 を識別せず、

前記第 1 のプライマー / プローブのセットは、配列番号 1 7、1 9 および 2 1、ならびに配列番号 1 7、1 9 および 2 1 と少なくとも 70 % 相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つから選択され；

前記第 2 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 6 6 を選択し、H P V 血清型 5 6 に対して H P V 血清型 6 6 を識別せず、

前記第 2 のプライマー / プローブのセットは、配列番号 1 8、2 0、2 2 および 2 3、ならびに配列番号 1 8、2 0、2 2 および 2 3 と少なくとも 70 % 相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つから選択されるマルチプレックスアッセイ。

【請求項 3】

ヒトパピローマウイルス (H P V) の複数の血清型を検出するためのプローブセットであって、

該プローブセットが、少なくとも第 1、第 2 及び第 3 の 3 つのオリゴヌクレオチドプライマー / プローブのセットを備え、

そのセットの各々が、

検出可能な形で標識され、ヌクレオチド配列の長さが 1 0 から 2 6 である少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドプローブと、各々のヌクレオチド配列の長さが 1 0 から 2 5 である少なくとも 2 つのオリゴヌクレオチドプライマーとを備え、

各プライマー / プローブのセットは、前記 H P V 生物の特定の血清型に対して少なくとも優先的であり、

前記第 1 のプライマー / プローブのセットおよび第 2 のプライマー / プローブのセットは、互いに対して縮重しており、前記縮重プローブは各々、同じチャネルにおいて検出可能なシグナルを発するシグナル部分を有し、

前記第 3 のプライマー / プローブのセットは、前記第 1 のプライマー / プローブのセットおよび第 2 のプライマー / プローブのセットのいずれに対しても縮重しておらず、前記縮重プライマー / プローブのセットが優先的にアニーリングする血清型ではない第 3 の血清型を識別し、

前記第 3 のプライマー / プローブのセットは、前記第 1 のプライマー / プローブのセットおよび第 2 のプライマー / プローブのセットにおけるプローブの波長と同じかまたは異なる波長のシグナルを発するシグナル部分を有し、

前記縮重プライマー / プローブのセットの標的は、配列番号 3 6 ~ 3 8 からなる群から選択される、ことを特徴とするプローブセット。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のプローブセットであって、

10

20

30

40

50

a)

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号36であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型51を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセット及び第2のプライマー／プローブのセットのいずれに対しても縮重しておらず、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、配列番号24～29、および配列番号24～29と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型39を選択し、HPV血清型68に対してHPV血清型39を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号1、3および5、ならびに配列番号1、3および5と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第2のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型68を選択し、HPV血清型39に対してHPV血清型68を識別せず、

前記第2のプライマー／プローブのセットは、配列番号2、4および6、ならびに配列番号2、4および6と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択されるプローブセット、

または、

b)

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号37であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型59を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセット及び第2のプライマー／プローブのセットのいずれに対しても縮重しておらず、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、配列番号30～35、および配列番号30～35と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型33を選択し、HPV血清型58に対してHPV血清型33を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号7、9、11、13、および15、ならびに配列番号7、9、11、13、および15と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型58を選択し、HPV血清型33に対してHPV血清型58を識別せず、

前記第2のプライマー／プローブのセットは、配列番号8、10、12、14および16、ならびに配列番号8、10、12、14および16と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択されるプローブセット、

または、

c)

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号38であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型59を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセット及び第2のプライマー／プローブのセットのいずれに対しても縮重しておらず、前記第3のプライマー／プローブのセットは、配列番号30～35、および配列番号30～35と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型56を選択し、HPV血清型56に対してHPV血清型66を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号17、19および21、ならびに配列番号17、19および21と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択

10

20

30

40

50

される配列のうちの少なくとも 1 つから選択され；

前記第 2 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 6 6 を選択し、H P V 血清型 5 6 に対して H P V 血清型 6 6 を識別せず、

前記第 2 のプライマー / プローブのセットは、配列番号 1 8 、 2 0 、 2 2 、および 2 3 、ならびに配列番号 1 8 、 2 0 、 2 2 、および 2 3 と少なくとも 7 0 % 相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つから選択されるプローブセット。

【請求項 5】

ヒトパピローマウイルス (H P V) の複数の血清型を検出するためのキットであって、該キットが、少なくとも第 1 、第 2 及び第 3 の 3 つのオリゴヌクレオチドプライマー / プローブのセットを備え、

そのセットの各々が、

前記 H P V 生物の特定の血清型のための、検出可能な形で標識された、ヌクレオチド配列の長さが 1 0 から 2 6 である少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドプローブと、各々のヌクレオチド配列の長さが 1 0 から 2 5 である少なくとも 2 つのオリゴヌクレオチドプライマーとを備え、

前記第 1 のプライマー / プローブのセットおよび第 2 のプライマー / プローブのセットは、互いに対して縮重しており、前記縮重プローブは各々、同じチャネルにおいて検出可能なシグナルを発するシグナル部分を有し、

前記第 3 のプライマー / プローブのセットは、前記他の 2 つのプライマー / プローブのセットに対して縮重しておらず、前記縮重プライマー / プローブのセットが優先的にアニーリングする血清型ではない第 3 の血清型を識別し、

前記第 3 のプライマー / プローブのセットは、前記縮重プライマー / プローブにおけるプローブのシグナル部分により発せられる波長と同じかまたは異なる波長のシグナルを発するシグナル部分を有し、

前記第 1 の縮重プライマー / プローブのセットおよび第 2 の縮重プライマー / プローブのセットについての、前記縮重プライマー / プローブのセットの標的は、配列番号 3 6 ~ 3 8 からなる群から選択される、ことを特徴とするキット。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のキットであって、

a)

前記縮重プライマー / プローブのセットの標的は、配列番号 3 6 であり、

前記第 1 の縮重プライマー / プローブのセットは、配列番号 1 と、 3 と、および 5 とを含み、

前記第 2 の縮重プライマー / プローブのセットは、配列番号 2 と、 4 と、および 6 とを含むキット、

または、

b)

前記縮重プライマー / プローブのセットの標的は、配列番号 3 7 であり、

前記第 1 の縮重プライマー / プローブのセットは、配列番号 7 と、配列番号 1 5 と、ならびに配列番号 9 、 1 1 、および 1 3 のうちの 1 つとを含み、

前記第 2 の縮重プライマー / プローブのセットは、配列番号 8 と、配列番号 1 5 と、ならびに配列番号 1 0 、 1 2 、および 1 4 のうちの 1 つとを含むキット、

または、

c)

前記縮重プライマー / プローブのセットの標的は、配列番号 3 8 であり、

前記第 1 の縮重プライマー / プローブのセットは、配列番号 1 7 と、 1 9 と、および 2 1 とを含み、

前記第 2 の縮重プライマー / プローブのセットは、配列番号 1 8 と、配列番号 2 0 と、ならびに配列番号 2 2 および 2 3 のうちの 1 つとを含むキット。

【請求項 7】

10

20

30

40

50

前記第3のプライマー／プローブのセットは、配列番号24～26、配列番号27～29、配列番号30～32、および配列番号33～35からなる群から選択されることを特徴とする請求項5に記載のキット。

【請求項8】

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型51を識別し、配列番号24～26および配列番号27～29からなる群から選択されることを特徴とする請求項5に記載のキット。

【請求項9】

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型59を識別し、配列番号30～32および配列番号33～35からなる群から選択されることを特徴とする請求項5に記載のキット。

10

【請求項10】

前記第3のプライマー／プローブのセットの検出プローブの前記シグナル部分は、前記第1のプライマー／プローブのセットおよび前記第2のプライマー／プローブのセットの検出プローブにより発せられる波長と同じ波長を発することを特徴とする請求項5に記載のキット。

【請求項11】

前記第3のプライマー／プローブのセットの検出プローブの前記シグナル部分は、前記第1のプライマー／プローブのセットおよび前記第2のプライマー／プローブのセットの検出プローブにより発せられる波長と異なる波長を発することを特徴とする請求項5に記載のキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その開示が参照により本明細書に組み込まれる、2010年2月16日に出願された、米国特許仮出願第61/304,941号明細書の出願日の利益を主張する。

【0002】

配列表

本出願は、EFSウェブを介して提出された、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含有する。2011年1月31日に作成された前記ASCIコピーは、「HPVの類縁血清型を検出するための配列表」と名付けられ、サイズは7.55キロバイトである。

30

【背景技術】

【0003】

80種を超えるヒトパピローマウイルス(HPV)が同定されている。HPVの異なる型は、良性の増殖性疣瘍から悪性腫瘍に至る多様な生物学的表現型を引き起こす(総説として、非特許文献1を参照されたい)。HPV6およびHPV11が、良性の疣瘍と関連することがきわめて一般的であるのに対し、HPV16およびHPV18は、悪性病変と最も高頻度で関連する、危険性の高い型である。したがって、臨床試料における特定のHPV型を決定することは、HPV関連疾患を発症する危険性を予測するのにきわめて重要である。

40

【0004】

in situハイブリダイゼーション、サザンプロット解析、ハイブリッドキャプチャ、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によるウイルス核酸の検出など、複数の核酸ベースの方法が、臨床試料における特定のHPV型を同定および定量化するのに用いられている。Hybrid Capture(登録商標)II(Qiagen, Inc.、Valencia, CA)アッセイは、抗体の捕捉および非放射性シグナルの検出を用いるが、所与のHPV型のセットのうちの単一の標的を検出するに過ぎない(例えば、非特許文献2を参照されたい)。加えて、Hybrid Capture(登録商標)IIア

50

ッセイは、RNAプローブのカクテル（プローブカクテルは、危険性の高いHPV型に対しても、危険性の低いHPV型に対しても使用可能である）を用いるため、試料において検出される特定のHPV型についての情報をもたらさず、危険性の高いHPVまたは危険性の低いHPVの存在についての陽性または陰性を示すに過ぎない。同様に、多くのPCRベースの方法も、単一の特定のHPV標的配列を増幅した後に、結果として得られるアンプリコンを膜に転写し、放射性標識したオリゴヌクレオチドプローブによりプローブするステップを伴うことが多い。

【0005】

他の方法は、試料中に存在する多くのHPV型をPCR増幅することが可能な市販のコンセンサスプライマーを用いることにより、特定の異なる型のHPV遺伝子間における高10度の相同性を利用する。次いで、型特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いて、特定のHPV型の存在を同定する。例えば、非特許文献3、非特許文献4を参照されたい。同様に、縮重のPCRプライマーを用いるアッセイも、HPV型間の相同性を利用し、特定のプライマーセットを用いる方法より多数のHPV型の検出を可能とする。例えば、非特許文献5を参照されたい。このようなアッセイもまた、特定のHPV型を同定するのに、さらなる実験を必要とする。

【0006】

上記で説明したPCR法は、複数の問題と関連しうる。例えば、HPV型における反応効率の差異は、結果として、一部の型の増幅を、他の型の増幅と比べて不均衡とする可能性がある。加えて、増幅についての平衡は、試料中に高コピー数で存在する型の方に偏り、この型によりPCR反応の成分が消費されるため、少数のHPV型がより増幅されにくくなる。

20

【0007】

当技術分野ではまた、リアルタイムのPCR産物の検出を可能とし、放射性物質の必要を排除する、5'エキソヌクレアーゼによる蛍光性のPCRベースのアッセイ（Taq-Man PCR）も説明されている。例えば、特許文献1、非特許文献6を参照されたい。この方法は、PCRプライマー間の標的DNAとハイブリダイズする、蛍光レポーター（フルオロフォア）およびクエンチャーチャーを含む標識されたプローブを用いる。フルオロフォアの励起は、結果として、フルオロフォアによる蛍光シグナルの放出をもたらし、この蛍光シグナルは、クエンチャーチャーにより消光される。PCRプライマーが伸長するときに遭遇する二本鎖DNAを分解し、これにより、プローブからフルオロフォアを放出する、Taq-DNAポリメラーゼの5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性により、アンプリコンを検出することができる。その後、蛍光シグナルが消光されることなく、標的DNAの量と正に相關する蛍光シグナルの蓄積を、自動式の蛍光測定器によりリアルタイムで検出することができる。

30

【0008】

Taq-Man PCRアッセイは、HPV型の検出用に適合されている。非特許文献7は、L1遺伝子の一部を増幅する型特異的なHPVプライマーを、型特異的なプローブと共に用いる、蛍光プローブアッセイについて開示している。Swanらのアッセイは、リアルタイムではなく、一定数のPCRサイクルの終点で蛍光シグナルを測定する（終点測定）。

40

【0009】

非特許文献8は、異なる蛍光色素により標識された型特異的なプローブと共に、E1遺伝子の高度に保存的な部分を標的とするTaq-Manアッセイについて報告している。特異的プライマーと縮重プライマーとの混合物を用いることにより、多数のHPV型が増幅された。Josefssonらは、1つのアッセイ当たり最大で3つの型特異的なプローブを用い、これは、異なるHPV型に由来するE1遺伝子の部分を検出するように設計されていた。Swanによるアッセイとは異なり、Josefssonらは、蛍光の蓄積をリアルタイムで測定した。

【0010】

50

非特許文献9は、E6/E7接合部にわたる保存領域を標的とするアッセイについて説明している。Josefssonによるアッセイと同様に、Tuckerらも、リアルタイムの検出、および型特異的な蛍光プローブを用いた。Tuckerらはまた、マルチプレックスPCRを用いて、同じ反応チューブ内で、HPV標的配列、および細胞内のアクチンの遺伝子座またはグロビンの遺伝子座を同時に検出した。

【0011】

HPVの検出に関する特定の難題のうちの1つは、臨床的な対象となるHPV型が多く存在するという事実である。HPVを検出するためのマルチプレックスアッセイが知られているが、これらのマルチプレックスアッセイは、検出のための比色チャネルの数により制限されている。これらのチャネルは、様々な光の波長（または波長の範囲もしくは帯域）である。各チャネルは、特定のチャネルの波長の光を発するシグナル部分により発せられるシグナルを検出する。したがって、検出されるHPV型の数は、アッセイにおいて明確に検出可能な、異なるシグナル部分の数により制限される。

10

【0012】

上記で説明したHPVアッセイの開発にもかかわらず、感度および再現度が高く、当技術分野において開示されている方法と比較して必要とされる人的時間が低減されたマルチプレックスアッセイを開発することは有利であろう。HPV型が多いことを踏まえるなら、存在するアッセイの検出チャネルより多くのHPV型を検出することが有用であろう。

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0013】

【特許文献1】米国特許第5,538,848号明細書

【特許文献2】欧州特許出願公開第0624643号明細書

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】McMurray et al., Int. J. Exp. Pathol. 82(1): 15-33 (2001)

【非特許文献2】Clavel et al., British J. Cancer 80(9): 1306-11 (1999)

【非特許文献3】Kleter et al., Journal of Clinical Microbiology 37(8): 2508-2517 (1999)

【非特許文献4】Gravitt et al., Journal of Clinical Microbiology 38 (1): 357-361 (2000)

30

【非特許文献5】Harwood et al., Journal of Clinical Microbiology 37(11): 3545-3555 (1999)

【非特許文献6】Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7276-7280 (1991)

【非特許文献7】Swan et al., Journal of Clinical Microbiology 35(4): 886-891 (1997)

【非特許文献8】Josefsson et al., Journal of Clinical Microbiology 37(3): 490-96 (1999)

【非特許文献9】Tucker et al., Molecular Diagnosis 6(1): 39-47 (2001)

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明は、Taq-Man化学反応を活用して、存在する検出のためのチャネルより多くのHPV型を同時に検出する、リアルタイムのPCR增幅を対象とする。言い換えれば、N個のチャネルを伴うアッセイにおいて、検出されるHPV型の数は、少なくともN+1個である。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本アッセイは、アッセイが検出するように構成されている各HPV型を検出するためのプライマー/プローブのセットを活用する。本アッセイによる検出に対して感受性である

50

多様な血清型には、例えば、H P V の 3 3 型、3 9 型、5 1 型、5 6 型、5 8 型、5 9 型、6 6 型、および 6 8 型が含まれる。当業者は、本明細書で説明されるプライマー／プローブのセットを、他の H P V 型（例えば、1 6 型、1 8 型、および 4 5 型）に対する他のプライマー／プローブのセットと組み合わせることを理解するであろう。単一のプライマー／プローブセットを用いて、少なくとも 1 つの型を検出する。T a q - M a n アッセイを用いる P C R 増幅の状況では、プライマー／プローブのセットは、少なくとも、フォワードプライマー、リバースプライマー、およびプローブである。互いに対しても縮重しているオリゴヌクレオチド配列を伴うプライマー／プローブ対のセットにより、少なくとも 2 つの型を選択する。本明細書で用いられる「縮重配列」とは、近縁の異なる型の同じ遺伝子の同じ遺伝子座と相補的であり、それらを 2 つの型に識別させるような、互いに対するわずかな配列のばらつきを有する、2 つのオリゴヌクレオチドプライマーまたはオリゴヌクレオチドプローブである。

【 0 0 1 7 】

本発明の一実施形態では、縮重プライマー／プローブのセットが、H P V の 3 9 型および 6 8 型を検出するためのセットである。このプライマー／プローブのセットは、両方の型の E 6 遺伝子における同じ遺伝子座を標的とする。この標的の長さは 9 1 ヌクレオチドであり、これを図 1 に示す。この標的は、E 6 遺伝子全体のうちの一セグメントであるに過ぎない。H P V の 3 9 型および 6 8 型の縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号 3 6 である。好ましい実施形態では、両方のプローブのシグナル部分が、C Y 5 として市販されているシアニン色素標識である。

【 0 0 1 8 】

この実施形態では、縮重していないプライマー／プローブのセットが、H P V の 5 1 型を識別する。5 1 型に対するプライマー／プローブのセットもまた、異なる遺伝子座においてであるが、E 6 遺伝子を標的とする。好ましい実施形態では、このプライマー／プローブのセットにおけるこのプローブのシグナル部分が F A M であり、これについては以下で具体的に確認する。

【 0 0 1 9 】

本発明の第 2 の実施形態では、縮重プライマー／プローブのセットが、H P V の 3 3 型および 5 8 型を検出するためのセットである。このプライマー／プローブのセットは、両方の型の E 6 遺伝子における同じ遺伝子座を標的とする。この標的の長さは 1 3 8 ヌクレオチドであり、これを図 2 に示す。この標的は、E 6 遺伝子全体のうちの一セグメントであるに過ぎない。H P V の 3 3 型および 5 8 型の縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号 3 7 である。好ましい実施形態では、両方のプローブのシグナル部分が、F A M である。

【 0 0 2 0 】

この実施形態では、縮重していないプライマー／プローブのセットが、H P V の 5 9 型を識別する。5 9 型に対するプライマー／プローブのセットもまた、E 6 遺伝子を標的とするが、必ずしも同じ遺伝子座ではない。好ましい実施形態では、このプライマー／プローブのセットにおけるこのプローブのシグナル部分が C Y 5 であり、これについては以下で具体的に確認する。

【 0 0 2 1 】

本発明の第 3 の実施形態では、縮重プライマー／プローブのセットが、H P V の 5 6 型および 6 6 型を検出するためのセットである。このプライマー／プローブのセットは、両方の型の E 6 遺伝子における同じ遺伝子座を標的とする。この標的の長さは 7 9 ヌクレオチドであり、これを図 3 に示す。この標的は、E 6 遺伝子全体のうちの一セグメントであるに過ぎない。H P V の 5 6 型および 6 6 型の縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号 3 8 である。好ましい実施形態では、両方のプローブのシグナル部分が、C Y 5 である。

【 0 0 2 2 】

この実施形態では、縮重していないプライマー／プローブのセットが、H P V の 5 9 型

10

20

30

40

50

を識別する。59型に対するプライマー／プローブのセットは、E6遺伝子を標的とする。好ましい実施形態では、このプライマー／プローブのセットにおけるこのプローブのシグナル部分がCY5であり、これについては以下で具体的に確認する。この実施形態では、HPVの59型に用いられるシグナル部分と同じシグナル部分を、HPVの56型_66型にもまた用いる。この実施形態では、同じ色素を同じチャネルに割り当てるので、HPVの59型と、56型_66型とは光学的に識別されることがない。

【0023】

この実施形態は、さらに別のHPV血清型に対するさらに別のプライマー／プローブのセット（縮重の場合もあり、識別性の場合もある）（例えば、HPVの33血清型および58血清型に対する縮重プライマー／プローブのセット）を活用するマルチプレックスアッセイを意図する。このHPVの他の血清型に対するシグナル部分は、CY5ではなく、CY5の発光波長とは検出可能な形で異なる波長で発光する（例えば、FAM）。

【0024】

他の実施形態では、HPVの59型に対するシグナル部分がFAMであり、これは、HPVの56血清型および66血清型に対する縮重プライマー／プローブのセットに対するCY5によるシグナル部分と光学的に識別されうる。

【0025】

代替的実施形態は、本明細書で説明されるプライマー／プローブのセットおよび縮重プライマー／プローブのセットによる任意の組合せおよびすべての組合せを伴うアッセイまたはプローブセットまたはキットを意図する。具体的に述べると、HPV血清型であるHPV51またはHPV59に対するプライマー／プローブのセットのうちの任意のセットを、HPV血清型であるHPV39_68、HPV33_58、およびHPV56_66に対する縮重プライマー／プローブのセットのうちの任意のセットと組み合わせることができる。具体的に述べると、HPV51に対するプライマー／プローブのセットを、HPV39_68、HPV33_58、およびHPV56_66のうちの1または複数による縮重プライマー／プローブのセットと組み合わせるアッセイまたはプローブセットまたはキットを意図する。HPV59に対するプライマー／プローブのセットを、HPV39_68、HPV33_58、およびHPV56_66のうちの1または複数による縮重プライマー／プローブのセットと組み合わせるアッセイまたはプローブセットまたはキットである。プローブのシグナル部分が同じ色素かまたは異なる色素である実施形態を意図する。マルチプレックスアッセイを意図するので、プライマー／プローブのセットを、HPVの他の血清型の存在または非存在を検出するように構成された他のプライマー／プローブのセットと組み合わせることができる。縮重プライマー／プローブのセットにおける検出プローブのシグナル部分が、HPVの51血清型または59血清型に対するプライマー／プローブのセットのシグナル部分と同じである実施形態では、マルチプレックスアッセイが、HPVの第4の血清型（例えば、HPV31、HPV52、HPV45など）に対する第4のプライマー／プローブのセットを包含し、この第4のプライマー／プローブのセットが、縮重プライマー／プローブのセットおよびHPV51またはHPV59のプライマー／プローブのセットの検出プローブのシグナル部分と異なるシグナル部分を有することを意図する。本明細書ではまた、1つのアッセイにおいて2つの縮重プライマー／プローブのセットを組み合わせるマルチプレックスアッセイも意図する。例えば、1つのマイクロウェルにおいて、HPVの33血清型および58血清型の存在を検出するための、第1の縮重プライマー／プローブのセットを、HPVの56血清型および66血清型の存在または非存在を検出するための、第2の縮重プライマー／プローブのセットと組み合わせることができる。これらの実施形態では、第1の縮重プライマー／プローブのセットのプローブが、第2の縮重プライマー／プローブのセットのシグナル部分の発光波長とは検出可能な形で異なる波長で発光するシグナル部分を有する。この例では、HPVの33血清型および58血清型に対するプローブのシグナル部分がFAMであり、HPVの56血清型および66血清型に対するプローブのシグナル部分がCY5となる。

【0026】

10

20

30

40

50

上記で説明したシグナル発生部分に加えて、プローブはまた、非蛍光性のダーククエンチャーも有する。適切なダーククエンチャーの一例は、BHQ (商標) 1 (Biosearch Technologies) であり、これは、FAMフルオロフォアと共に用いるのに適する。適切なクエンチャーの別の例は、BHQ (商標) 2 (Biosearch Technologies) であり、これは、CY5フルオロフォアと共に用いるのに適する。シグナル発生部分の他の例は当業者によく知られており、本明細書では詳述しない。

【0027】

本明細書で用いられる「プライマー」という用語は、核酸鎖に相補的であるプライマーの伸長産物の合成が触媒される条件下に置かれたとき、相補鎖に沿った合成の始点として作用することが可能なオリゴヌクレオチドを指す。このような条件は、適切な緩衝液（「緩衝液」は、補因子であるか、またはイオン強度、pHなどに影響を及ぼす成分を包含する）中で、適切な温度における、4つの異なるデオキシリボヌクレオシド三リン酸およびDNAポリメラーゼまたは逆転写酵素などの重合化誘導剤の存在を包含する。本明細書で用いられるオリゴヌクレオチドプライマーは、精製された制限消化産物の場合のように、天然の場合もあり、または合成により作製される場合もある。増幅における効率を最大とするには、プライマーが一本鎖であることが好ましい。

【0028】

本明細書で用いられる「プライマー対」とは、PCRによるアンプリコンを生成させる核酸ポリメラーゼの存在下において、核酸のセグメントのPCR増幅に関与することができる、フォワードプライマーおよびリバースプライマーの2つのプライマーを指す。プライマー対を含むプライマーは、同じHPV遺伝子に特異的であり、その結果として、単一のHPV遺伝子に由来するヌクレオチド配列からなるアンプリコンを生成させることができ。代替的に、プライマー対を含むプライマーは、HPVゲノム内で互いにに対して近接する範囲内に位置する、異なるHPV遺伝子に特異的であり、これにより、複数の遺伝子に由来するヌクレオチド配列からなるアンプリコンを生成させることも可能である。

【0029】

本発明のフルオロフォアについて本明細書で用いられる「異なるイメージングスペクトル」とは、各フルオロフォアが、特定のアッセイで用いられる他のすべてのフルオロフォアと比べて異なる発光極大値においてエネルギーを発することを意味する。固有の発光極大値を伴うフルオロフォアを用いることにより、特定のアッセイにおいて用いられる複数のフルオロフォアの各々により発せられる蛍光エネルギーを同時に検出することが可能となる。

【0030】

本明細書で用いられる、本発明のオリゴヌクレオチドプライマーおよびオリゴヌクレオチドプローブについて使用される「識別性」という用語は、前記プライマーおよびプローブが、単一のHPV型に特異的であることを意味する。これは、単一のHPV型に特異的であるが、他のHPV型とある程度の相同性も共有するHPVプライマーおよびHPVプローブを包含する。本発明の「識別性」のプライマーおよびプローブは、少なくとも1ヌクレオチド以上において、他のHPV型との3'側における相同性を欠くオリゴヌクレオチドを包含する。特定の位置において特定のHPV型に固有であり、アライメントにおいてこのHPV型を他のHPV型から識別するように作用するこのような残基を、「識別性塩基」と称する。オリゴヌクレオチドについての「識別性」という用語は、複数のHPV型に特異的であるプライマーおよびプローブ、すなわち、複数のHPV型との完全な相同性を共有するプライマーおよびプローブを包含しない。この点において、本明細書で開示される縮重プライマー/プローブのセットは、それに対してこれらの縮重プライマー/プローブのセットが構成されるHPV型を識別しない。例えば、HPVの39型および68型を標的とする縮重プライマー/プローブのセットについて述べると、HPVの39型に対するプライマー/プローブのセットは、HPVの39型をHPVの68型よりも優先するが、HPVの39型をHPVの68型に対して識別するわけではない。縮重プライマー

10

20

30

40

50

/プローブのセットは、H P V型を識別するわけではないため、プローブは、同じシグナル部分を有することが好ましい。アッセイは、凝集物におけるこれらのH P V型の存在または非存在を決定するように構成されているので、この目的で2つの光学的チャネルを用いる必要はない。さらに、マルチプレックスアッセイのための単一のマイクロウェルにおいて、縮重プライマー/プローブのセットを、他のプライマー/プローブのセットと混合する場合、他のプライマー/プローブのセット（識別性の場合もあり識別性でない場合もある）に対するシグナル部分は、同じ場合もあり、異なる場合もある。アッセイのシグナル部分は、大部分、設計の選択の問題である。当業者は、特定のH P V型が存在するかどうかを知る必要がある場合、同じマイクロウェルにおいて、プライマー/プローブのセットにおいて同じシグナル部分を用いるであろう。これらの型のうちの1つだけが存在するかどうかを知れば十分である場合は、異なるH P V血清型に対するプライマー/プローブのセットにおいて同じシグナル部分を用いることができる。

【0031】

本明細書で用いられる「アンプリコン」とは、核酸ポリメラーゼおよび特定のプライマーの存在下において、核酸を含む試料をP C R增幅することにより生成させる、特定のP C R反応産物を指す。アンプリコンは、単一のH P V型の単一の遺伝子に由来するヌクレオチド配列からなる場合もあり、アンプリコンは、単一のH P V型の複数の遺伝子に由来するヌクレオチド配列からなる場合もある。

【0032】

本明細書で用いられる「プライマー/プローブのセット」とは、単一のH P V型の特定のヌクレオチド配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーの対およびオリゴヌクレオチドプローブの組み分けを指す。前記オリゴヌクレオチドのセットは、（a）H P V型の核酸配列の第1の位置とハイブリダイズする識別性のフォワードプライマー；（b）第1の位置の下流にある、H P V型の核酸配列の第2の位置とハイブリダイズする識別性のリバースプライマー；および（c）これらのプライマー間に位置するH P V型の核酸配列とハイブリダイズする、フルオロフォアおよびクエンチャーで標識された蛍光プローブからなる。言い換えれば、オリゴヌクレオチドのセットは、単一のH P V型に特異的なアンプリコンの合成を開始させることができ、特定のP C Rプライマーのセットと、このアンプリコンとハイブリダイズする蛍光プローブとからなる。

【0033】

本明細書で用いられる「複数」とは、2つ以上を意味する。

【0034】

オリゴヌクレオチドのセット、オリゴヌクレオチドプライマー、またはオリゴヌクレオチドプローブについて本明細書で用いられる「特異的にハイブリダイズする」とは、前記オリゴヌクレオチドのセット、オリゴヌクレオチドプライマー、またはオリゴヌクレオチドプローブが、単一のH P V型の核酸配列とハイブリダイズすることを意味する。

【0035】

本明細書で用いられる「遺伝子」とは、ポリペプチド鎖の生成に関与する核酸のセグメントを意味する。遺伝子は、翻訳配列（コード領域）、ならびに5'側の非翻訳配列および3'側の非翻訳配列（非コード領域）のほか、個別のコードセグメント（エクソン）間の介在配列（インtron）も包含する。本発明の実施形態を説明する目的では、H P Vゲノムが、複数の遺伝子：例えば、L 1 遺伝子、L 2 遺伝子、およびE 1 遺伝子、E 2 遺伝子、E 4 ~ E 7 遺伝子を有する。

【0036】

本明細書で用いられる「遺伝子座」とは、形質に対応する遺伝子が存在する染色体上の位置を指す。遺伝子座という用語は、特定の遺伝子の対立遺伝子のうちのいずれか1つを包含する。遺伝子座はまた、異なるH P V型に由来する相同遺伝子も包含する。例えば、H P V 1 6 およびH P V 6 におけるL 1 遺伝子を検出するP C Rアッセイは、異なるH P V型に由来する配列を検出するにも関わらず、単一の遺伝子座についてのアッセイである。これに対し、例えば、単一のH P V型のL 1 遺伝子およびE 1 遺伝子を検出するアッセイ

10

20

30

40

50

イは、単一のH P V型を検出するアッセイではあるが、多重遺伝子座アッセイである。

【0037】

本明細書で用いられる「H P V」とは、ヒトパピローマウイルスを意味する。「H P V」とは、現在知られているものであれ、以下で説明されるものであれ、任意の種類のH P Vを指すのに用いられる一般的な用語である。

【0038】

本明細書で用いられる「フルオロフォア」とは、レーザー、タンクステン灯、水銀灯、もしくはキセノン灯、または発光ダイオードで励起されると、確定したスペクトルを有する光の形態でエネルギーを放出する蛍光レポーター分子を指す。蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)過程において、フルオロフォアから発せられる光は、その励起スペクトルが、このフルオロフォアの発光スペクトルと重複する第2の分子を励起させうる。フルオロフォアの発光エネルギーが別の分子へと移動することにより、フルオロフォアの発光を消光させる。この第2の分子は、クエンチャー分子として知られている。本明細書では、「フルオロフォア」という用語が、「蛍光レポーター」という用語と互換的に用いられる。

10

【0039】

本明細書で用いられる「クエンチャー」または「クエンチャー分子」とは、フルオロフォアを含む蛍光プローブと連結されると、フルオロフォアにより発せられるエネルギーを受け取り、これにより、フルオロフォアの発光を消光させることが可能な分子を指す。クエンチャーは、蛍光性で、受け取ったエネルギーを光として放出する場合もあり、非蛍光性で、受け取ったエネルギーを熱として放出する場合もあり、プローブの長さに沿った任意の位置に結合させることができる。

20

【0040】

本明細書で用いられる「ダーククエンチャー」とは、非蛍光性クエンチャーを指す。

【0041】

本明細書で用いられる「プローブ」とは、該プローブのうちの少なくとも1つの配列による、標的領域内の配列または検出される領域内の配列との相補性のために、標的核酸内の配列と共に二重鎖構造を形成することが可能なオリゴヌクレオチドを指す。「プローブ」という用語は、フルオロフォアおよび結合させたクエンチャー分子を伴うかまたは伴わない、上記で説明したオリゴヌクレオチドを包含する。「蛍光プローブ」という用語は、フルオロフォアおよびクエンチャー分子を含むプローブを指す。

30

【0042】

本明細書で用いられる「F A M」とは、フルオロフォアである、6-カルボキシフルオレセインを指す。

【0043】

本発明の他の実施形態は、H P VのE 6 / E 7遺伝子領域に結合する、異なるオリゴヌクレオチド配列を用いる。本明細書で説明されるオリゴヌクレオチドは、標的核酸配列(およびその相補鎖)に結合することが可能な配列を有する。本明細書で説明されるオリゴヌクレオチドはまた、H P VのE 6 / E 7遺伝子の核酸配列を増幅することによる検出を容易とするように、単独で用いることもでき、組み合わせて用いることもできる。一実施形態では、遺伝子の標的部分において、T a q - M a n(登録商標)リアルタイムP C Rアッセイを実施するようにプローブを設計する。T a q - M a n(登録商標)リアルタイムP C Rアッセイに用いられる3つの縮重プローブのセット(それらのオリゴヌクレオチド配列との関係で説明される)の例については、以下で説明する。

40

【0044】

具体的に述べると、第1の縮重プライマー/プローブのセットがH P Vの39型および68型に対するセットである第1の実施形態では、H P Vの39型を優先するプライマー/プローブのセットが、配列番号1、3および5である。H P Vの68型を優先するプライマー/プローブのセットは、配列番号2、4および6である。配列番号1および2はいずれも、T a q - M a nのフォワードプライマーであり、互いに対しても縮重している。配列番号3および4はいずれも、T a q - M a nのリバースプライマーであり、互いに対し

50

て縮重している。配列番号 5 および 6 はいずれも、Taq-Man のプローブであり、互いに対しても縮重している。HPV の 33 型および 58 型に対する縮重プライマー / プローブのセットは、配列番号 7 ~ 16 であり、これには、2 つの代替的なりバースプライマーの配列が含まれるが、配列番号 13 および 14 が好ましい。HPV の 56 型および 66 型に対する縮重プライマー / プローブのセットは、配列番号 17 ~ 23 である。HPV の 51 血清型を選択するかまたは識別するプライマー / プローブの配列は、配列番号 24 ~ 29 である。HPV の 59 型を選択するかまたは識別するプライマー / プローブの配列は、配列番号 30 ~ 35 である。上記で言及したすべての配列を、以下の表 1 に列挙する。以下の表では、「D」を検出物質とし、「FP」をフォワードプライマーとし、「RP」をリバースプライマーとする。

【0045】

【表 1】

表 1

配列番号	名称	説明	オリゴヌクレオチド配列 : 5' - 3'
配列番号 1	GR39_68E6 FP2 (39)	HPV 39 E6 Taq-Man フォワード プライマー	CCACTAGCTGCATGCCAATC
配列番号 2	GR39_68E6 FP2 (68)	HPV 68 E6 Taq-Man フォワード プライマー	CCATTAGCTGCATGCCAATC
配列番号 3	GR39_68E6 RP4 (39)	HPV 39 E6 Taq-Man リバース プライマー	CTAATGTTGCATACACCGA
配列番号 4	GR39_68E6 RP4 (68)	HPV 68 E6 Taq-Man リバース プライマー	CTAATGTTGCATACACCGA
配列番号 5	GR39_68D5 (39)	HPV 39 E6 Taq-Man プローブ	GAGTAATATCGTAGCTCCGTATTT
配列番号 6	GR39_68D5 (68)	HPV 68 E6 Taq-Man プローブ	GAGTAATATCGTAGTTCCGTATTT
配列番号 7	GR33_58FP2 (33)	HPV 33 E6 Taq-Man フォワード プライマー	TGTGCCAAGCATTGGAGACA

【0046】

10

20

30

【表2】

配列番号 8	GR33_58FP2 (58)	HPV 58 E6 Taq-Man フォワード プライマー	TGTGTCAGGCCGTGGAGACA
配列番号 9	GR33_58RP2 (33)	HPV 33 E6 Taq-Man リバース プライマー	CAAATGGATTTCCTCTCTATA
配列番号 10	GR33_58RP2 (58)	HPV 58 E6 Taq-Man リバース プライマー	CAAATGGATTTCATCTCTATA
配列番号 11	GR33_58RP3 (33)	HPV 33 E6 Taq-Man リバース プライマー	CCTCTCTATATAACAACGTAAA
配列番号 12	GR33_58RP3 (58)	HPV 58 E6 Taq-Man リバース プライマー	CCATCTCTATACACTATTCTTAAA
配列番号 13	GR33_58RP4 (33)	HPV 33 E6 Taq-Man リバース プライマー	AAATGGATTCCCTCTCTATATAAC
配列番号 14	GR33_58RP4 (58)	HPV 58 E6 Taq-Man リバース プライマー	AAATGGATTCCATCTCTATACAC
配列番号 15	GR33_58D1 (33)	HPV 33 E6 Taq-Man プローブ	TCATATAACCTCAGATCGTTCGAAAG
配列番号 16	GR33_58D1 (58)	HPV 58 E6 Taq-Man プローブ	TCATATAACCTCAGATCGCTCGAAAG
配列番号 17	MP56_66FP (56)	HPV 56 E7 Taq-Man フォワード プライマー	ACCTAATAACACGTACCTTGTT
配列番号 18	MP56_66FP (66)	HPV 66 E7 Taq-Man フォワード プライマー	ACCTAATTCAACGTACCTTGTT
配列番号 19	MP56_66RP (56)	HPV 56 E7 Taq-Man リバース プライマー	ACACGCAGGTCCCTTTGGT
配列番号 20	MP56_66RP (66)	HPV 66 E7 Taq-Man リバース プライマー	ACACGTAGCTCCCTTTGGT
配列番号 21	MP56_66D (56)	HPV 56 E7 Taq-Man プローブ	TGTAAGTTGTGGTGCAGTTGGACA
配列番号 22	MP56_66D (66.1)	HPV 66 E7 Taq-Man プローブ	TGTGAGCTTGTGGTGCAGTTGGACA
配列番号 23	MP56_66D (66.2)	HPV 66 E7 Taq-Man プローブ	TGTGAGTTGGTGGTGCAGTTGGACA
配列番号 24	51E6 FP	HPV 51 E6 フォワード プライマー	GCAGTATGCCAAACAATGTCAC
配列番号 25	51E6 RP	HPV 51 E6 リバース プライマー	TAGTAATTGCCTCTAATGTAGTA

【0047】

【表3】

配列番号 26	51E6 D	HPV 51 E6 Taq-Man プローブ	CCTGCTATAACGTCTATACTCTCTA
配列番号 27	51E7 FP	HDV 51 E7 フォワード プライマー	CTCAGAGGAGGAGGATGAAG
配列番号 28	51E7 RP	HPV 51 E7 リバース プライマー	TGAACACCTGCAACACGGAG
配列番号 29	51E7 D	HPV 51 E7 Taq-Man プローブ	CTACCAGAAAGACGGGCTGGAC
配列番号 30	59E6 FP	HPV 59 E6 フォワード プライマー	GGAGAACATTAGAGGCTGAA
配列番号 31	59E6 RP	HPV 59 E6 リバース プライマー	ATAGAGGTTTAGGCATCTATAA
配列番号 32	59E6 D	HPV 59 E6 Taq-Man プローブ	ACCGTTACATGAGCTGCTGATAACG
配列番号 33	59E7 FP	HPV 59 E7 フォワード プライマー	GAAGTTGACCTTGTGTGCTAC
配列番号 34	59E7 RP	HPV 59 E7 リバース プライマー	ATTAACCTCCATCTGGTTCATCTT
配列番号 35	59E7 D	HPV 59 E7 Taq-Man プローブ	ATTACCTGACTCCGACTCCGAGAA
配列番号 36	HPV39型および 68型の縮重 プライマー / プローブセットの 標的領域	91スクレオチド の標的領域	CCATTAGCTGCATGCCAATCATGTATTA AATTTTATGCTAAAATACGGGAACCTACG ATATTACTCAGAATCGGTGTATGCCACA ACATTAG
配列番号 37	HPV33型および 58型の縮重 プライマー / プローブセットの 標的領域	138スクレオチド の標的領域	TGTGCCAAGCATTGGAGACAACTATACA CAACATTGAACTACAGTGGCTGGAATGC AAAAAGACTTTGCAACGATCTGAGGTAT ATGATTTGCATTTGCAGATTAAACAGT TGTATATAGAGAGGGAAATCCATTG
配列番号 38	HPV56型および 66型の縮重 プライマー / プローブセットの 標的領域	79スクレオチド の標的領域	ACCTAATAACACGTACCTTGTGTXAGTG TAAGTTTGTGGTGCAGTTGGACATTCA AGTACCAAAGAGGACCTGCGTGT

【0048】

上記の表に記載したプライマー / プローブのセットの標的領域の位置を、以下の表1Aに記載する。

【0049】

【表4】

10

20

30

40

表1A: 標的領域の位置

遺伝子型	GenBank の受託番号	標的領域の座標
39	M62849	287 ~ 377
68	EU918769	181 ~ 271
33	M12732	152 ~ 288
58	D90400	153 ~ 289
56	X74483	747 ~ 825
66	EF177190	747 ~ 825

【0050】

50

縮重プライマー／プローブのセットの標的領域間には配列の相同性が存在するが、これらの領域の座標は、遺伝子型に依存する。

【0051】

さらなる実施形態では、本方法は、異なるが近縁の2つのHPV型を選択するための少なくとも1つの縮重プライマー／プローブのセットと、第3のHPV型を識別するプライマー／プローブのセットとを用いて試料を処理する工程を含む。この場合、縮重プローブのシグナル部分は同じ波長のシグナルを発し、好ましくは、2つの縮重プローブでシグナル発生部分は同じである。第3のHPV型を識別するプライマー／プローブのセットのシグナル発生部分は、縮重プローブのシグナル発生部分により発せられる波長とは異なり、したがって、個別に検出可能である波長のシグナルを発する。これらのプライマー／プローブのセットは、増幅された核酸産物の存在または非存在を検出するための核酸増幅反応において用いられる。

【0052】

別の実施形態では、HPVを検出するためのキットが提供される。該キットは、異なるが近縁の2つのHPV型を選択する少なくとも1つの縮重プライマー／プローブのセットと、第3のHPV型を識別するプライマー／プローブのセットとを包含する。この場合、縮重プローブのシグナル部分は、同じ波長のシグナルを発し、好ましくは、2つの縮重プローブでシグナル発生部分は同じである。第3のHPV型を識別するプライマー／プローブのセットのシグナル発生部分は、縮重プローブのシグナル発生部分により発せられる波長とは異なり、したがって、個別に検出可能である波長のシグナルを発する。プライマー／プローブのセットは、その生物を検出するのに用いることができる標的配列を増幅することが可能である。キットには、増幅アッセイを実施するためのオリゴヌクレオチドのうちの1または複数、および緩衝剤試薬が備えられている。

【0053】

キットのさらに別の態様では、Taq-Man PCRを目的とするオリゴヌクレオチドおよび試薬を提供することができる。この態様では、3つのオリゴヌクレオチドが提供される。3つのオリゴヌクレオチドのうちの2つは、増幅プライマーであり、第3のオリゴヌクレオチドは、検出物質として構成されている。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】HPVの68型のE6遺伝子の標的領域を示し、この標的配列の、HPVの68型の各種の突然変異、HPVの39型及びHPVの39型の突然変異における縮重を、HPVの39型および68型に対する縮重プライマー／プローブのセットと共に概略的に示す図である。

【図2A】HPVの33型のE6遺伝子の標的領域を示し、この標的配列の、HPVの33型の各種の突然変異、HPVの58型及びHPVの33型の突然変異における縮重を、HPVの33型および58型に対する縮重プライマー／プローブのセットと共に概略的に示す図である。

【図2B】HPVの33型のE6遺伝子の標的領域を示し、この標的配列の、HPVの33型の各種の突然変異、HPVの58型及びHPVの33型の突然変異における縮重を、HPVの33型および58型に対する縮重プライマー／プローブのセットと共に概略的に示す図である。

【図3】HPVの66型のE7遺伝子の標的領域を示し、この標的配列の、HPVの66型の各種の突然変異、HPVの56型及びHPVの56型の突然変異における縮重を、HPVの56型および66型に対する縮重プライマー／プローブのセットと共に概略的に示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0055】

本明細書で説明されるオリゴヌクレオチドプローブおよびオリゴヌクレオチドプローブのセットは、とりわけ、HPV型を選択または識別する目的で設計される。具体的に述べ

10

20

30

40

50

ると、近縁の 2 つの H P V 型のうちの 1 つを何らかの形で選択する縮重プライマー / プローブのセットを、前記近縁の H P V 型とは異なる、第 3 のさらなる H P V 型を識別する、少なくとも 1 つの他のプライマー / プローブのセットと組み合わせる。

【 0 0 5 6 】

試料中に特定の H P V 型が存在する場合は、プライマー / プローブのセットが、検出可能なシグナルをもたらす。

【 0 0 5 7 】

好ましい実施形態では、他の方法（例えば、T M A 法および L C R 法）もまた意図されるが、P C R（例えば、T a q - M a n P C R）である検出法が用いられる。さらに、存在する検出のためのチャネルより多くの H P V 型を検出するためのキットも開示される。

10

【 0 0 5 8 】

図 1 に言及すると、H P V 型に特異的な縮重プライマー / プローブのセットが、図示される E 6 遺伝子の標的領域とのアライメントとの関連で記載されている。図 1 は、フォワードプライマー領域 1 0、T a q - M a n 検出領域 2 0、およびリバースプライマー領域 3 0 を示す。図 1 はまた、縮重フォワードプライマー 1 1、1 2、縮重リバースプライマー 3 1、3 2、ならびに縮重プローブ 2 1 および 2 2 も、標的配列 4 0 におけるそれらの対応する領域との関連で示す。ボックス 6 0、7 0、および 8 0 には、標的配列 4 0 における、フォワードプライマー領域、リバースプライマー領域、および検出プローブ領域に対する変化だけを示す。これらの領域間における配列の縮重に注目すると、このことから、これらの領域では配列の変化が増大するために、これらの領域はそれほど望ましくないことを観察することができる。

20

【 0 0 5 9 】

例えば、ボックス 6 0 では、ボックス 6 0 により枠囲いされた標的配列 4 0 の部分と、H P V の 3 9 型標的の同じ E 6 部分との間に一塩基多型（T、C）が見られることに注目されたい。ボックス 6 0、7 0、および 8 0 は、H P V の 6 8 型および 3 9 型の異なる株の標的に対する塩基多型を示す。これらの異なる株、ならびに塩基多型（標的に対する）の数および位置を、表 2 で報告する。

【 0 0 6 0 】

【表 5】

30

表 2: 標的に関して図 1 において示される多型

型 / 株	多型の数 (5' 端からの位置)
68型	
68_A7_High_45240-DQ80079.seq	3 [T(6位) ; G(66位) ; T(84位)]
68_A7_High_45240-EU918769.seq	なし
BD115-68_900bp.seq	3 [C(21位) ; A(46位) ; C(81位)]
BD-637-68_900_bp.seq	1 [G(31位)]
T276-68_900bp.seq	なし
T1177-68_900bp.seq	3 [TまたはC(6位) ; C(81位) ; TまたはT(84位)]
T1610-68_900bp_071309.seq	2 [G(53位) ; C(81位)]
39型	
23, A7, High, 10568, M62849.seq	6 [C(4位) ; A(27位) ; G(51位) ; G(66位) ; C(69位) ; T(84位)]
S492-39_900bp.seq	8 [T(3位) ; C(4位) ; A(27位) ; G(51位) ; G(66位) ; C(69位) ; G(80位) ; T(84位)]
T296-39_900bp.seq	7 [C(4位) ; A(27位) ; G(51位) ; C(57位) ; G(66位) ; C(69位) ; T(84位)]

【 0 0 6 1 】

50

H P V 3 9 のフォワードプライマー 1 1 は、 H P V 6 8 のフォワードプライマー 1 2 に
対して一塩基多型を有し、したがってこれに対して縮重している。フォワードプライマー
1 1 を配列番号 1 とし、フォワードプライマー 1 2 を配列番号 2 とする。2 つの配列間に
おける縮重が容易に観察される。

C C A C T A G C T G C A T G C C A A T C
C C A T T A G C T G C A T G C C A A T C

下線を付すことにより各縮重を示す。

【 0 0 6 2 】

縮重は、フォワードプライマーには、 H P V の 3 9 型に結合することを優先させ、フォ
ワードプライマー 1 2 には、 H P V の 6 8 型に結合することを優先させる。縮重プライマー
10 / プローブのセットは、1 つの H P V 型の標的に結合することを、他の型の標的に結合
することより優先するが、識別するわけではない。図について述べると、プライマー / プ
ローブのセットは、標的との関連で記載されている。ボックス 6 0 、 7 0 、および 8 0 は
、ボックス 6 0 、 7 0 、および 8 0 により枠囲いされる標的領域 4 0 との関連で、 H P V
の 3 9 型および 6 8 型における縮重についての情報を含有する。これは、位置の指示であ
り、ハイブリダイゼーションの指示ではない。具体的に述べると、リバースプライマー 3
1 および 3 2 (配列番号 3 および 4) は、標的 4 0 のそれらの対応する位置において、これ
らの配列の逆相補体である配列を有する。同様に、検出プローブ 2 1 および 2 2 (配列
番号 5 および 6) は、標的 4 0 のそれらの対応する位置において、これらの配列の逆相補
体である。フォワードプライマー 1 1 および 1 2 (配列番号 1 および 2) は、標的 4 0 の
それらの対応する位置における配列に対して相同である。 20

【 0 0 6 3 】

図 2 A ~ B は、図 1 と同様であるが、 H P V の 3 3 型および 5 8 型を選択する縮重プライマー / プローブのセットについての図である。ボックス 1 6 0 、 1 7 0 、および 1 8 0 は、 H P V の 3 3 型および 5 8 型の異なる株の標的に対する塩基多型を示す。これらの異
なる株、ならびに塩基多型 (標的に対する) の数および位置を、表 3 で報告する。多型の
位置は、図 2 に示す。

【 0 0 6 4 】

【表 6】

表3: 標的に関して図2A～Bにおいて示される多型

型 / 株	多型の数
33型	
33_A9_High_10586_EF422125.seq	3 [C(30位) ; A(62位) ; C(63位)]
33_A9_High_10586_EF422126.seq	3 [C(62位) ; C(63位) ; T(52位)]
33_A9_High_10586_EF566920.seq	3 [C(62位) ; C(63位) ; A(99位)]
33_A9_High_10586_EF566921.seq	2 [C(62位) ; C(63位)]
33_A9_High_10586_EF918766.seq	4 [G(58位) ; C(62位) ; C(63位) ; G(122位)]
33_A9_High_10586_GO374550.seq	1 [A(62位)]
33_A9_High_10586_GO374551.seq	2 [G(54位) ; A(62位)]
33_A9_High_10586_GO374552.seq	2 [T(10位) ; A(62位)]
33_A9_High_10586_M12732.seq	2 [A(62位) ; C(63位)]
BD670_grp33_900bp.seq	1 [A(62位)]
BD783-33_900bp.seq	3 [C(62位) ; C(63位) ; C(92位)]
BD783-33_clone_900bp.seq	2 [C(62位) ; C(63位)]
TI093-33_900bp.seq	2 [G(54位) ; A(62位)]
58型	
HPV_58_D60400.seq	23 [位置については、図2A～Bを参照されたい]
T-275-58_900bp.seq	22 [位置については、図2A～Bを参照されたい]
T-276-58_900bp.seq	24 [位置については、図2A～Bを参照されたい]
T-817-58_clone_900bp.seq	23 [位置については、図2A～Bを参照されたい]
58_A9_High_E6_10598_AF478160	23 [位置については、図2A～Bを参照されたい]
58_A9_High_E6_10598_AF478167	22 [位置については、図2A～Bを参照されたい]
58_A9_High_E6_10598_AF234531	23 [位置については、図2A～Bを参照されたい]
58_A9_High_E6_10598_AF478157	23 [位置については、図2A～Bを参照されたい]
58_A9_High_E6_10598_EU080239	25 [位置については、図2A～Bを参照されたい]
58_A9_High_E6_10598_FJ407192	24 [位置については、図2A～Bを参照されたい]
58_A9_High_E6_10598_GO248229	23 [位置については、図2A～Bを参照されたい]
58_A9_High_E6_10598_GO248253	22 [位置については、図2A～Bを参照されたい]

【0065】

図2A～Bは、フォワードプライマー領域110、Taq-Man検出領域120、およびリバースプライマー領域130を示す。図2A～Bはまた、縮重フォワードプライマー111、112、縮重リバースプライマー131、132、ならびに縮重プローブ121および122も、標的配列140におけるそれらの対応する領域との関連で示す。ボックス160(図2A)、ボックス170および180(図2B)には、標的配列140における、フォワードプライマー領域、リバースプライマー領域、および検出プローブ領域に対する変化だけを示す。

【0066】

10

20

30

40

50

例えば、ボックス160では、ボックス60により枠囲いされた標的配列140の部分と、HPVの33型標的の同じE6部分との間に一塩基多型（T、G、G）が見られることに注目されたい。しかし、HPV58のフォワードプライマー112は、HPV33のフォワードプライマー111に対して3つの一塩基多型を有し、したがってこれに対して縮重している。フォワードプライマー111を配列番号7とし、フォワードプライマー112を配列番号8とする。2つの配列間における縮重が容易に観察される。

T G T G C C A A G C A T T G G A G A C A

T G T G T C A G G C G T T G G A G A C A

下線を付すことにより各縮重を示す。

【0067】

縮重は、フォワードプライマー111には、HPVの33型に結合することを優先させ、フォワードプライマー112には、HPVの58型に結合することを優先させる。縮重プライマー／プローブのセットは、1つのHPV型の標的に結合することを、他の型の標的に結合することより優先するが、識別するわけではない。図について述べると、プライマー／プローブのセットは、標的との関連で記載されている。ボックス160、170、および180は、ボックス160、170、および180により枠囲いされる標的領域140との関連で、HPVの33型および58型間における縮重についての情報を含有する。これは、位置の指示であり、ハイブリダイゼーションの指示ではない。具体的に述べると、リバースプライマー131および132（配列番号13および14）は、標的140のそれらの対応する位置において、これらの配列の逆相補体である配列を有する。同様に、検出プローブ121および122（配列番号15および16）は、標的140のそれらの対応する位置において、これらの配列の逆相補体である。フォワードプライマー111および112（配列番号7および8）は、標的140のそれらの対応する位置における配列に対して相同である。

【0068】

図3は、図1および2と同様であるが、HPVの56型および66型を選択する縮重プライマー／プローブのセットについての図である。図3は、フォワードプライマー領域210、Taq-Man検出領域220、およびリバースプライマー領域230を示す。ボックス260、270、および280は、HPVの66型および56型の異なる株の標的に対する塩基多型を示す。これらの異なる株、ならびに塩基多型（標的に対する）の数および位置を、表2で報告する。

【0069】

10

20

30

【表7】

表4: 標的に関して図3において示される多型

型 / 株	多型の数 (5' 端からの位置)
66型	
66_A6_High_37119-EF177191	6 [T(8位) ; A(24位) ; G(30位) ; C(33位) ; G(71位) ; A(74位)]
66_A6_High_37119-EF177188	7 [T(8位) ; T(9位) ; A(24位) ; G(30位) ; C(33位) ; G(71位) ; A(74位)]
66_A6_High_37119-EF177186	6 [T(8位) ; A(24位) ; G(30位) ; G(35位) ; G(71位) ; A(74位)]
56型	
56_A6_High_37119-EF177176	2 [G(24位) ; C(56位)]
56_A6_High_37119-EF177178	3 [C(20位) ; C(23位) ; C(24位)]
56_A6_High_37119-EF177179	1 [C(24位)]
56_A6_High_37119-EF177180	1 [G(24位)]
BD616grp56_E7	3 [G(24位) ; T(54位) ; C(56位)]
T1631-56_E7	1 [A(24位)]

10

20

【0070】

図3はまた、縮重フォワードプライマー211、212、縮重リバースプライマー231、232、ならびに縮重プローブ221および222も、標的配列240におけるそれらの対応する領域との関連で示す。ボックス260、270、および280には、標的配列240における、フォワードプライマー領域、リバースプライマー領域、および検出プローブ領域に対する変化だけを示す。

【0071】

例えば、ボックス260では、ボックス260により枠囲いされた標的配列240の部分と、HPV66標的およびHPV56標的との間に2つの一塩基多型(T、C)が見られることに注目されたい。しかし、HPV56のフォワードプライマー2112は、HPV66のフォワードプライマー211に対して一塩基多型を有し、したがってこれに対して縮重している。フォワードプライマー211を配列番号17とし、フォワードプライマー212を配列番号18とする。2つの配列間における縮重が容易に観察される。

ACCTAATACACGTACCTTGT
ACCTAATTCACGTACCTTGT

下線を付すことにより各縮重を示す。

【0072】

縮重は、フォワードプライマー211には、HPVの56型に結合することを優先させ、フォワードプライマー212には、HPVの66型に結合することを優先させる。縮重プライマー／プローブのセットは、1つのHPV型の標的に結合することを、他の型の標的に結合することより優先するが、識別するわけではない。図について述べると、プライマー／プローブのセットは、標的との関連で記載されている。ボックス260、270、および280は、ボックス260、270、および280により枠囲いされる標的領域240との関連で、HPVの56型および66型における縮重についての情報を含有する。これは、位置の指示であり、ハイブリダイゼーションの指示ではない。具体的に述べると、リバースプライマー231および232(配列番号19および20)は、標的240のそれらの対応する位置において、これらの配列の逆相補体である配列を有する。同様に、検出プローブ221および222(配列番号22および23)は、標的240のそれらの対応する位置において、これらの配列の逆相補体である。フォワードプライマー211お

30

40

50

および 212 (配列番号 17 および 18) は、標的 240 のそれらの対応する位置における配列に対して相同である。具体的には論じないが、縮重プライマー / プローブのセットにおけるリバースプライマー間の縮重およびプローブ間の縮重も容易に観察される。

【 0073 】

本明細書で説明される縮重プライマー / プローブのセットの例に加えて、当業者は、本明細書における説明および添付図に基づいて、縮重プライマー / プローブのセットを設計しうる、近縁の血清型の他の標的領域も同定することができるであろう。図により容易に観察される通り、所望の標的領域は、個別の血清型の間に数個の多型を有するであろう。存在する多型には、本明細書で説明される形と一致する縮重プライマー / プローブのセットを設計する中で対処することができる。

10

【 0074 】

以下で説明される通り、プライマーおよびプローブは、標的配列の領域との相補性が 100 % 未満であるが、これらの領域に結合しうる。必須の相補性の程度は、結合条件の厳密性を含めた多様な因子に依存する。用いられる厳密性の条件に応じて、プライマーおよびプローブを、それらの配列内に異なる塩基を包含し、なおも標的の核酸領域に結合するのに十分な程度に相補的であるように改変することができる。本明細書で用いられる十分な程度の相補性には、70 % 以上の相補性が含まれる。好ましい実施形態では、プライマー / プローブの標的配列に対する相補性は、これらのプライマー / プローブの結合部分の全長の少なくとも 80 % である。プライマーおよびプローブの標的配列に対する相補性は、90 % 以上であることがより好ましい。

20

【 0075 】

言い換えれば、本発明は、本明細書において配列番号により具体的に同定されるプライマーおよびプローブと少なくとも 70 % の相同性を有するプライマーおよびプローブを意図する。好ましい実施形態では、本明細書において配列番号により具体的に同定されるプライマーおよびプローブと少なくとも 80 % の相同性を有するプライマー / プローブが意図される。より好ましくは、本明細書において配列番号により具体的に同定されるプライマーおよびプローブと少なくとも 90 % の相同性を有するプライマーおよびプローブが意図される。

【 0076 】

本明細書で説明されるオリゴヌクレオチドは、それらが識別する H P V 標的のそれぞれの部分に結合するのに十分な程度に相補的でなければならないが、ある時点において、オリゴヌクレオチドの配列の標的に対する相補性が低下し、他の核酸配列に結合する可能性もあることが認識される。したがって、オリゴヌクレオチドプローブが、標的遺伝子のそれぞれの部分との十分な相補性を維持し、それぞれの標的結合部位に対する選択性を失わないことが望ましい。

30

【 0077 】

オリゴヌクレオチドによる增幅プライマー内の標的結合配列は一般に、その 3' 端に位置する。標的結合配列は、約 10 ~ 25 ヌクレオチドの長さであることが可能であり、增幅プライマーとのハイブリダイゼーションの特異性を有することができる。したがって、当業者は、標的結合配列を変化させて、增幅プライマーのハイブリダイゼーションの特異性を効果的に変化させ、代替的な配列とハイブリダイゼーションさせることができる。これが理解される。

40

【 0078 】

当業者には、増幅アッセイにおいて用いられるオリゴヌクレオチドが、有用性または標的配列への特異性を失わずに、ある程度改変しうることが理解される。例えば、当技術分野で知られている通り、ハイブリダイゼーションの条件を、厳密性を増大または減少させるように調整することにより（すなわち、ハイブリダイゼーションの温度または緩衝液の塩含量を調整することにより）、相補的な核酸配列および部分的に相補的な核酸配列のハイブリダイゼーションを得ることができる。開示される配列に対するこのようなわずかな改変、およびハイブリダイゼーションの条件に対する任意の必要な調整により標的特異性

50

を維持するのに要求されるのは、常法に従う実験だけであり、当技術分野の範囲内にある。

【0079】

プライマーとして有用なオリゴヌクレオチドを設計するときの一般的な指針として述べると、配列の相同性を1%低下させることに、 T_m を約1～1.5低下させる。温度範囲は、約60と約70との間で変化させうるが、プライマーは、60±4で最適であるように設計する場合があり、プローブは、70±4で最適であるように設計する場合がある。增幅プライマーを設計する場合のさらなる考慮点は、グアニンおよびシトシンの含量でありうる。一般に、プライマーのGC含量は、約60～70%でありうるが、またこれ未満とすることも可能であり、当業者により適切に調整されうる。アニーリングの条件を、厳密性を増大または減少させるように調整することにより（すなわち、アニーリングの温度または緩衝液の塩含量を調整することにより）、相補的な核酸配列および部分的に相補的な核酸配列のアニーリングを得ることができる。開示される配列に対するこのような変更、およびアニーリングの条件に対する任意の必要な調整により標的特異性を維持するのに要求されるのは、常法に従う実験だけであり、当技術分野の範囲内にある。

10

【0080】

Walkerら、上記により教示されている通り、本明細書で説明されるプライマーを用いる增幅反応は、チミンを組み込むことも可能であり、例えば、特許文献2において教示されている通り、後続の增幅反応による交差汚染を低減するのに、反応において、TTPを、2' - デオキシウリジン5' - 三リン酸で完全にまたは部分的に置換することも可能である。dU（ウリジン）を増幅産物に組み込み、ウラシルDNAグリコシラーゼ（UDG）で処理することによりこれを切除することができる。これらの無塩基部位により、この増幅産物は、後続の増幅反応において増幅不可能となる。後続の増幅を実施する前に、UDGを、ウラシルDNAグリコシラーゼ阻害剤（Ugi）により不活化して、新たに形成された増幅産物におけるdUの切除を防止することができる。

20

【0081】

本発明で用いるのに意図されるPCR DNAポリメラーゼは、5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する（例えば、Promega製のSequencing Grade Tag、またはNew England Biolabs製のDeep Vent_R（商標）（エクソ）DNAが用いられる）。プローブは、PCR増幅プライマーの下流において、標的とハイブリダイズする。下流におけるエンドヌクレアーゼによる合成がプライマーから進行するにつれて、プライマー間に配置されるプローブが置換される。熱サイクリングが、PCRによる増幅の特徴であるので、増幅のエンドポイントにおいて検出するには、プライマーのアニーリングおよび伸長の最終サイクルの後の低温において、制限エンドヌクレアーゼを添加することが好ましい。しかし、PCR反応の高温のフェーズを経ても活性を維持する、好熱性の制限エンドヌクレアーゼを増幅において存在させ、リアルタイムアッセイをもたらすことも可能であろう。二次構造が直鎖化され、色素対が分離されれば、蛍光の消光が低減されるので、強度などの蛍光パラメータの変化が、標的増幅の指標として用いられる。

30

【0082】

検出プローブのオリゴヌクレオチドの変性または直鎖化から生じる蛍光の変化は、反応内の選択されるエンドポイントにおいて検出することができる。しかし、二次構造の直鎖化は、ハイブリダイゼーションまたはプライマーの伸長と同時にもたらされるため、蛍光の変化もまた、反応が生じるのにつれて、すなわち、「リアルタイム」でモニタリングすることができる。この均一でリアルタイムのアッセイフォーマットを用いて、存在する標的の初期量について、半定量的情報または定量的情報をもたらすことができる。標的配列の初期コピーがより多く存在すれば、ドナーの蛍光は、選択した閾値に、より迅速に到達する（すなわち、陽性までの時間が短縮される）。アクセプターの蛍光が低減される場合も同様に、選択した最小値に到達するのに必要とされる時間として検出される、陽性まで

40

50

の時間が短縮される。加えて、反応経過における蛍光パラメータの変化速度も、含有する標的の初期量が低量である試料におけるより、含有する標的の初期量が多量である試料においてより迅速となる（すなわち、蛍光曲線の傾きが増大する）。当技術分野において知られるこれらの測定または他の測定は、標的の存在の指標として、または標的の増幅の指標として行うことができる。標的の初期量は、実験結果を、標的の既知量についての結果と比較することにより決定することが典型的である。

【0083】

本発明の方法による、選択された標的配列の存在についてのアッセイは、溶液中で実施することもでき、固相上で実施することもできる。検出プローブのオリゴヌクレオチドがプライマーとして機能するリアルタイムの均一アッセイまたはエンドポイントにおける均一アッセイは、溶液中で実施することが典型的である。本発明の検出プローブオリゴヌクレオチドを用いるハイブリダイゼーションアッセイはまた、溶液中でも実施しうる（例えば、均一なリアルタイムアッセイとして）が、また、リアルタイムで標的を検出するかまたはエンドポイントで標的を検出するための固相アッセイにも特に好適である。固相アッセイでは、当技術分野で知られる方法を用いる内部標識または末端標識を介して、検出プローブのオリゴヌクレオチドを、固相（例えば、ビーズ、膜、または反応容器）上に固定化することができる。例えば、ビオチンで標識化した検出プローブのオリゴヌクレオチドを、アビジンで修飾した固相上に固定化することができ、この固相において、適切なハイブリダイゼーション条件下で標的に曝露すると、この検出プローブのオリゴヌクレオチドは、蛍光の変化をもたらす。このようにして標的を捕捉することにより、試料から標的を分離することが容易となり、シグナルの検出またはアッセイの他の側面に干渉しうる、試料中の物質の除去が可能となる。

【0084】

製品化の便宜のため、HPVの核酸を特異的に検出および同定するのに有用なオリゴヌクレオチドを、キットの形態でパッケージ化することができる。このようなキットは、本明細書で説明される少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含有することが典型的である。また、核酸増幅反応を実施するための試薬も、HPV特異的なオリゴヌクレオチドと共に含めることができる。例えば、緩衝液、他のオリゴヌクレオチド、ヌクレオチド三リン酸、酵素なども含めることができる。キットの構成要素は、共通の容器内に併せてパッケージ化することができる。場合によって、本発明の方法の具体的な実施形態を実施するための1つの実施形態の記載を例示する指示書も含めることができる。また、他の任意選択の構成要素、例えば、アッセイプローブとして用いるのに適する標識をタグ付したオリゴヌクレオチド、および/またはこの標識を検出するための試薬もしくは手段も、キット内に含めることができる。

【0085】

さらに、キットは、オリゴヌクレオチドおよび試薬を、乾燥形式で包含する場合もあり、液体形式で包含する場合もある。乾燥形式とすれば、キットの構成要素を、より安定的なものとすることができます、容易に操作することができる。キットの乾燥させた構成要素を、マイクロ滴定プレート、マイクロアレイ、または他の適切な容器などの固相に対して添加または前処理することもでき、この場合、試料および緩衝液を添加しさえすればよい。この形式は、複数の試料を同時にアッセイすることを容易とし、ハイスループット法において有用である。BDによるProbeTec（商標）装置およびViper（商標）XTTR装置を用いることができる。

【0086】

以下の実施例は、本明細書で説明される本発明の具体的な実施形態を例示する。当業者には明らかである通り、各種の変化および改変が可能であり、これらは、説明される本発明の範囲内にあることが意図されている。

【実施例】

【0087】

表1のプライマー/プローブのセットを用いる、「HPVを検出するためのTaq-M

10

20

30

40

50

an PCRシステム」を、以下で実施例としてさらに説明する。上記の表1に記載したプライマー／プローブのセットは、HPVの39型、および68型、および51型に対して、Taq-Man PCRを実施するために設計した。具体的に述べると、第1の縮重プライマー／プローブのセットがHPVの39型および68型に対するセットである第1の実施形態では、HPVの39型を優先するプライマー／プローブのセットが、配列番号1、3および5である。HPVの68型を優先するプライマー／プローブのセットは、配列番号2、4および6である。

【0088】

Taq-ManリアルタイムPCRは、定量的PCRの一種である。Taq-Manでは、20～26ヌクレオチドの一本鎖のオリゴヌクレオチドであり、2つのPCRプライマーの間にあるDNA配列だけに結合するように設計されている、蛍光性プローブを用いる。Taq-Manでは、レポーター色素およびクエンチャーカラーを、プローブに結合させている。温度を交互に変化させてDNAを変性させ、再アニーリングさせることにより、プローブをDNAにアニーリングさせる。Taqポリメラーゼにより、ヌクレオチドが標的DNAに付加され、これにより、鋳型のDNAからTaq-Manプローブが除去される。レポーター色素が、クエンチャーカラーから分離されると、レポーター色素は、検出可能であるエネルギーを発する。このエネルギーは、コンピュータにより定量化され、これにより、標的が検出されたことを示すシグナルがもたらされる。Taq-Man PCRにおいて蛍光シグナルを発生させうるのは、特異的なPCR産物だけである。

【0089】

本明細書の例では、熱サイクリングが意図される。95℃で15分間にわたる最初の変性ステップの後、標的の存在または非存在を検出するための、プライマー／プローブのセットと試料とのPCR混合物を、40サイクルにわたり、55℃で1分間の後、95℃で30秒間の熱サイクルにかける。

【0090】

Taq-Man PCRを実施するには、好みの産物サイズを50～150塩基対とする2つのPCRプライマーと、蛍光レポーターまたはフルオロフォア（例えば、6-カルボキシフルオレセイン（FAM）およびテトラクロロフルオレセイン（TET））、ならびにその5'端および3'端に共有結合により結合させた、テトラメチルロダミン（TAMRA）などのクエンチャーカラー、または既に説明したようなダーククエンチャーカラーを伴うプローブとを用いる。適切な蛍光レポーターおよびフルオロフォアはよく知られており、本明細書では詳述しない。

【0091】

10

20

30

【表8】

表5:HPVの39型、68型、および51型についてのTaq-ManアッセイのためのTaq-Man PCRプローブセットの例

配列番号	プローブの内容	オリゴヌクレオチド5'配列3'	ORFの位置(bp) (Genbankの受託番号)
配列番号1	HPV 39 E6 Taq-Man フォワード プライマー	CCACTAGCTGCATGCCAATC	10 287~306 (M62849)
配列番号2	HPV 68 E6 Taq-Man フォワード プライマー	CCATTAGCTGCATGCCAATC	
配列番号3	HPV 39 E6 Taq-Man リバース プライマー	CTAATGTTAGTTGCATACACCGA	
配列番号4	HPV 68 E6 Taq-Man リバース プライマー	CTAATGTTGTTGCATACACCGA	
配列番号5	HPV 39 E6 Taq-Man プローブ	GAGTAATATCGTAGCTCCGTATTT	
配列番号6	HPV 68 E6 Taq-Man プローブ	GAGTAATATCGTAGTTCCGTATTT	
配列番号24	HPV 51 E6 フォワード プライマー	GCAGTATGCACAAATGTTCAC	20 277~298 (M62877)
配列番号25	HPV 51 E6 リバース プライマー	TAGTAAATTGCCTCTAATGTAGTA	
配列番号26	HPV 51 E6 Taq-Man プローブ	CCTGCTATAACGTCTACTCTCTA	
配列番号27	HPV 51 E7 フォワード プライマー	CTCAGAGGAGGAGGATGAAG	
配列番号28	HPV 51 E7 リバース プライマー	TGAACACCTGCAACACGGAG	
配列番号29	HPV 51 E7 Taq-Man プローブ	CTACCAGAAAGACGGGCTGGAC	30 692~713 (M62877) 40

【0092】

プローブは、表に記載されるHPVのE6/E7遺伝子内のORF位置にアニーリングするように設計する。これについて、HPV59に対するプライマープローブ/セットのORF位置を、E6遺伝子およびE7遺伝子の両方について、以下の表に列挙する。

【0093】

【表9】

表6：HPVの59型に対するプライマー／プローブセットのE6／E7におけるORF位置

配列番号	プローブの内容	オリゴヌクレオチド (5' -配列-3')	ORFの位置(bp) (Genbankの 受託番号)
配列番号30	HPV 59 E6 フォワード プライマー	GGAGAAACATTAGAGGCTGAA	313～333 (X77858)
配列番号31	HPV 59 E6 リバース プライマー	ATAGAGGTTTTAGGCATCTATAA	369～391 (X77858)
配列番号32	HPV 59 E6 Taq-Man プローブ	ACCGTTACATGAGCTGCTGATACG	342～365 (X77858)
配列番号33	HPV 59 E7 フォワード プライマー	GAAGTTGACCTTGTGTGCTAC	605～625 (X77858)
配列番号34	HPV 59 E7 リバース プライマー	ATTAACCTCCATCTGGTTCATCTT	660～682 (X77858)
配列番号35	HPV 59 E7 Taq-Man プローブ	<u>ATTACCTGACTCCGACTCCGAGAA</u>	631～654 (X77858)

【0094】

プライマーおよびプローブに加えて、Taq-Man PCRは、データを解析するためのリアルタイムPCR装置のみならず、通常のPCRに用いられる試薬（例えば、ポリメラーゼ、遊離ヌクレオチド）も必要とする。これらの試薬および装置は、当業者によく知られており、本明細書では詳述しない。

以下、本明細書に記載の発明につき列記する。

[1]

生物学的試料における生物の複数の血清型の存在または非存在を検出するマルチプレックスアッセイであって、

前記アッセイは、存在する検出のためのチャネルより多くの血清型を検出し、

前記マルチプレックスアッセイが、

生物学的試料を用意するステップと；

前記生物学的試料を少なくとも3つのオリゴヌクレオチドプライマー／プローブのセットと接触させるステップであって、

そのセットの各々が、

検出可能な形で標識されており、ヌクレオチド配列の長さが約10から約50である少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプローブと、

それらの各々のヌクレオチド配列の長さが約10から約150である少なくとも2つのオリゴヌクレオチドプライマーとを備え、

前記接触が、プローブおよびプライマーが標的配列にアニーリングするような条件下で行われ、

各プライマー／プローブのセットは、生物の特定の血清型に対して少なくとも優先的であり、

前記第1のプライマー／プローブのセットおよび第2のプライマー／プローブのセットは、互いに対して縮重しており、

10

20

30

40

50

前記縮重プローブは各々、同じチャネルにおいて検出可能なシグナルを発するシグナル部分を有し、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、前記他の2つのプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、前記縮重プライマー／プローブのセットが優先的にアニーリングする血清型ではない第3の血清型を識別し、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、前記縮重プローブのシグナル部分により発せられる波長と同じまたは異なる波長のシグナルを発するシグナル部分を有する、ステップと；

存在する場合は、前記標的配列を増幅するステップと；

前記プローブセットの前記標的配列に対するハイブリダイゼーションの指標としての標識を検出のためにモニタリングし、これにより、HPVの血清型のうちの少なくとも1つの存在または非存在を示すステップと、

を含むことを特徴とするマルチプレックスアッセイ。

[2]

前記生物はヒトパピローマウイルス(HPV)であることを特徴とする[1]に記載のアッセイ。

[3]

前記縮重プライマー／プローブのセットの前記標的是、配列番号36～38からなる群から選択されることを特徴とする[2]に記載のアッセイ。

[4]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的是、配列番号36であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型51を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセットまたは第2のプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、配列番号24～29、および配列番号24～29と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型39を選択し、HPV血清型68に対してHPV血清型39を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号1、3および5、ならびに配列番号1、3および5と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第2のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型68を選択し、HPV血清型39に対してHPV血清型68を識別せず、

前記第2のプライマー／プローブのセットは、配列番号2、4および6、ならびに配列番号2、4および6と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択される、

ことを特徴とする[2]に記載のアッセイ。

[5]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的是、配列番号37であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型59を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセットまたは第2のプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、配列番号30～35、および配列番号30～35と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型33を選択し、HPV血清型58に対してHPV血清型33を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号7、9、11、13、および15、ならびに配列番号7、9、11、13、および15と少なくとも70%相同である配

10

20

30

40

50

列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第2のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型58を選択し、HPV血清型33に対してHPV血清型58を識別せず、

前記第2のプライマー／プローブのセットは、配列番号8、10、12、14、および16、ならびに配列番号8、10、12、14、および16と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択される、

ことを特徴とする[2]に記載のアッセイ。

[6]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号38であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型59を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセットまたは第2のプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、配列番号30～35、および配列番号30～35と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型56を選択し、HPV血清型56に対してHPV血清型66を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号17、19および21、ならびに配列番号17、19および21と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第2のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型66を選択し、HPV血清型56に対してHPV血清型66を識別せず、

前記第2のプライマー／プローブのセットは、配列番号18、20、22、および23、ならびに配列番号18、20、22、および23と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択される、

ことを特徴とする[2]に記載のアッセイ。

[7]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号36であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型51を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセットまたは第2のプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、配列番号24～29、および配列番号24～29と少なくとも80%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型39を選択し、HPV血清型68に対してHPV血清型39を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号1、3および5、ならびに配列番号1、3および5と少なくとも80%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第2のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型68を選択し、HPV血清型39に対してHPV血清型68を識別せず、

前記第2のプライマー／プローブのセットは、配列番号2、4および6、ならびに配列番号2、4および6と少なくとも80%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択される、

ことを特徴とする[2]に記載のアッセイ。

[8]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号37であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型59を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセットまたは第2のプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、

10

20

30

40

50

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号30～35、および配列番号30～35と少なくとも80%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型33を選択し、HPV血清型58に対してHPV血清型33を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号7、9、11、13、および15、ならびに配列番号7、9、11、13、および15と少なくとも80%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第2のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型58を選択し、HPV血清型33に対してHPV血清型58を識別せず、

前記第2のプライマー／プローブのセットは、配列番号8、10、12、14、および16、ならびに配列番号8、10、12、14、および16と少なくとも80%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択される、

ことを特徴とする[2]に記載のアッセイ。

[9]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号38であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型59を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセットまたは第2のプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、配列番号30～35、および配列番号30～35と少なくとも80%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型56を選択し、HPV血清型56に対してHPV血清型66を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号17、19および21、ならびに配列番号17、19および21と少なくとも80%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第2のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型66を選択し、HPV血清型56に対してHPV血清型66を識別せず、

前記第2のプライマー／プローブのセットは、配列番号18、20、22、および23、ならびに配列番号18、20、22、および23と少なくとも80%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択される、

ことを特徴とする[2]に記載のアッセイ。

[10]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号36であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型51を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセットまたは第2のプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、配列番号24～29、および配列番号24～29と少なくとも90%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型39を選択し、HPV血清型68に対してHPV血清型39を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号1、3および5、ならびに配列番号1、3および5と少なくとも90%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第2のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型68を選択し、HPV血清型39に対してHPV血清型68を識別せず、

前記第2のプライマー／プローブのセットは、配列番号2、4および6、ならびに配列番号2、4および6と少なくとも90%相同である配列からなる群から選択される配列の

10

20

30

40

50

うちの少なくとも 1 つから選択される、
ことを特徴とする [2] に記載のアッセイ。

[1 1]

前記縮重プライマー / プローブのセットの標的は、配列番号 3 7 であり、
前記第 3 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 5 9 を識別するように構成
され、前記第 1 のプライマー / プローブのセットまたは第 2 のプライマー / プローブのセ
ットに対して縮重しておらず、
前記プライマー / プローブのセットは、配列番号 3 0 ~ 3 5 、および配列番号 3 0 ~ 3
5 と少なくとも 9 0 % 相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも
1 つから選択され；

前記第 1 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 3 3 を選択し、H P V 血清
型 5 8 に対して H P V 血清型 3 3 を識別せず、

前記第 1 のプライマー / プローブのセットは、配列番号 7 、 9 、 1 1 、 1 3 、および 1
5 、ならびに配列番号 7 、 9 、 1 1 、 1 3 、および 1 5 と少なくとも 9 0 % 相同である配
列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つから選択され；

前記第 2 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 5 8 を選択し、H P V 血清
型 3 3 に対して H P V 血清型 5 8 を識別せず、

前記第 2 のプライマー / プローブのセットは、配列番号 8 、 1 0 、 1 2 、 1 4 、および
1 6 、ならびに配列番号 8 、 1 0 、 1 2 、 1 4 、および 1 6 と少なくとも 9 0 % 相同である配
列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つから選択される、

ことを特徴とする [2] に記載のアッセイ。

[1 2]

前記縮重プライマー / プローブのセットの標的は、配列番号 3 8 であり、
前記第 3 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 5 9 を識別するように構成
され、前記第 1 のプライマー / プローブのセットまたは第 2 のプライマー / プローブのセ
ットに対して縮重しておらず、

前記プライマー / プローブのセットは、配列番号 3 0 ~ 3 5 、および配列番号 3 0 ~ 3
5 と少なくとも 9 0 % 相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも
1 つから選択され；

前記第 1 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 5 6 を選択し、H P V 血清
型 5 6 に対して H P V 血清型 6 6 を識別せず、

前記第 1 のプライマー / プローブのセットは、配列番号 1 7 、 1 9 および 2 1 、ならび
に配列番号 1 7 、 1 9 および 2 1 と少なくとも 9 0 % 相同である配列からなる群から選択
される配列のうちの少なくとも 1 つから選択され；

前記第 2 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 6 6 を選択し、H P V 血清
型 5 6 に対して H P V 血清型 6 6 を識別せず、

前記第 2 のプライマー / プローブのセットは、配列番号 1 8 、 2 0 、 2 2 、および 2 3
、ならびに配列番号 1 8 、 2 0 、 2 2 、および 2 3 と少なくとも 9 0 % 相同である配列か
らなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つから選択される、

ことを特徴とする [2] に記載のアッセイ。

[1 3]

ヒトパピローマウイルス (H P V) の複数の血清型を検出するためのプローブセットで
あって、

該プローブセットが、少なくとも 3 つのオリゴヌクレオチドプライマー / プローブのセ
ットを備え、

そのセットの各々が、検出可能な形で標識されており、ヌクレオチド配列の長さが約 1
0 から約 5 0 である少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドプローブと、各々のヌクレオチ
ド配列の長さが約 1 0 から約 1 5 0 である少なくとも 2 つのオリゴヌクレオチドプライマ
ーとを備え、

各プライマー / プローブのセットは、前記 H P V 生物の特定の血清型に対して少なくと

10

20

30

40

50

も優先的であり、

前記第1のプライマー／プローブのセットおよび第2のプライマー／プローブのセットは、互いに対して縮重しており、前記縮重プローブは各々、同じチャネルにおいて検出可能なシグナルを発するシグナル部分を有し、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、前記第1のプライマー／プローブのセットおよび第2のプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、前記縮重プライマー／プローブのセットが優先的にアニーリングする血清型ではない第3の血清型を識別し、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、前記第1のプライマー／プローブのセットおよび第2のプライマー／プローブのセットにおけるプローブの波長と同じかまたは異なる波長のシグナルを発するシグナル部分を有する、

ことを特徴とするプローブセット。

[14]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号36～38からなる群から選択されることを特徴とする[13]に記載のプローブセット。

[15]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号36であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型51を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセットまたは第2のプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、配列番号24～29、および配列番号24～29と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型39を選択し、HPV血清型68に対してHPV血清型39を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号1、3および5、ならびに配列番号1、3および5と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第2のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型68を選択し、HPV血清型39に対してHPV血清型68を識別せず、

前記第2のプライマー／プローブのセットは、配列番号2、4および6、ならびに配列番号2、4および6と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択される、

ことを特徴とする[13]に記載のプローブセット。

[16]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号37であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型59を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセットまたは第2のプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、

前記プライマー／プローブのセットは、配列番号30～35、および配列番号30～35と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型33を選択し、HPV血清型58に対してHPV血清型33を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号7、9、11、13、および15、ならびに配列番号7、9、11、13、および15と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型58を選択し、HPV血清型33に対してHPV血清型58を識別せず、

前記第2のプライマー／プローブのセットは、配列番号8、10、12、14、および

10

20

30

40

50

16、ならびに配列番号8、10、12、14、および16と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択される、ことを特徴とする[13]に記載のプローブセット。

[17]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号38であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型59を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセットまたは第2のプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、

前記プライマー／プローブのセットは、配列番号30～35、および配列番号30～35と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型56を選択し、HPV血清型56に対してHPV血清型66を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号17、19および21、ならびに配列番号17、19および21と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第2のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型66を選択し、HPV血清型56に対してHPV血清型66を識別せず、

前記第2のプライマー／プローブのセットは、配列番号18、20、22、および23、ならびに配列番号18、20、22、および23と少なくとも70%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択される、

ことを特徴とする[13]に記載のプローブセット。

[18]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号36であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型51を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセットまたは第2のプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、

前記プライマー／プローブのセットは、配列番号24～29、および配列番号24～29と少なくとも80%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型39を選択し、HPV血清型68に対してHPV血清型39を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号1、3および5、ならびに配列番号1、3および5と少なくとも80%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第2のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型68を選択し、HPV血清型39に対してHPV血清型68を識別せず、

前記第2のプライマー／プローブのセットは、配列番号2、4および6、ならびに配列番号2、4および6と少なくとも80%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択される、

ことを特徴とする[13]に記載のプローブセット。

[19]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号37であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型59を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセットまたは第2のプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、

前記プライマー／プローブのセットは、配列番号30～35、および配列番号30～35と少なくとも80%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型33を選択し、HPV血清

10

20

30

40

50

型 5 8 に対して H P V 血清型 3 3 を識別せず、

前記第 1 のプライマー / プローブのセットは、配列番号 7、9、11、13、および 15、ならびに配列番号 7、9、11、13、および 15 と少なくとも 80 % 相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つから選択され；

前記第 2 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 5 8 を選択し、H P V 血清型 3 3 に対して H P V 血清型 5 8 を識別せず、

前記第 2 のプライマー / プローブのセットは、配列番号 8、10、12、14、および 16、ならびに配列番号 8、10、12、14、および 16 と少なくとも 80 % 相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つから選択される、

ことを特徴とする [1 3] に記載のプローブセット。

10

[2 0]

前記縮重プライマー / プローブのセットの標的は、配列番号 3 8 であり、

前記第 3 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 5 9 を識別するように構成され、前記第 1 のプライマー / プローブのセットまたは第 2 のプライマー / プローブのセットに対して縮重しておらず、

前記プライマー / プローブのセットは、配列番号 3 0 ~ 3 5、および配列番号 3 0 ~ 3 5 と少なくとも 80 % 相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つから選択され；

前記第 1 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 5 6 を選択し、H P V 血清型 5 6 に対して H P V 血清型 6 6 を識別せず、

20

前記第 1 のプライマー / プローブのセットは、配列番号 1 7、1 9 および 2 1、ならびに配列番号 1 7、1 9 および 2 1 と少なくとも 80 % 相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つから選択され；

前記第 2 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 6 6 を選択し、H P V 血清型 5 6 に対して H P V 血清型 6 6 を識別せず、

前記第 2 のプライマー / プローブのセットは、配列番号 1 8、2 0、2 2、および 2 3、ならびに配列番号 1 8、2 0、2 2、および 2 3 と少なくとも 80 % 相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つから選択される、

ことを特徴とする [1 3] に記載のプローブセット。

[2 1]

30

前記縮重プライマー / プローブのセットの標的は、配列番号 3 6 であり、

前記第 3 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 5 1 を識別するように構成され、前記第 1 のプライマー / プローブのセットまたは第 2 のプライマー / プローブのセットに対して縮重しておらず、

前記プライマー / プローブのセットは、配列番号 2 4 ~ 2 9、および配列番号 2 4 ~ 2 9 と少なくとも 90 % 相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つから選択され；

前記第 1 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 3 9 を選択し、H P V 血清型 6 8 に対して H P V 血清型 3 9 を識別せず、

前記第 1 のプライマー / プローブのセットは、配列番号 1、3 および 5、ならびに配列番号 1、3 および 5 と少なくとも 90 % 相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つから選択され；

前記第 2 のプライマー / プローブのセットは、H P V 血清型 6 8 を選択し、H P V 血清型 3 9 に対して H P V 血清型 6 8 を識別せず、

前記第 2 のプライマー / プローブのセットは、配列番号 2、4 および 6、ならびに配列番号 2、4 および 6 と少なくとも 90 % 相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つから選択される、

ことを特徴とする [1 3] に記載のプローブセット。

[2 2]

前記縮重プライマー / プローブのセットの標的は、配列番号 3 7 であり、

50

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型59を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセットまたは第2のプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、

前記プライマー／プローブのセットは、配列番号30～35、および配列番号30～35と少なくとも90%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型33を選択し、HPV血清型58に対してHPV血清型33を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号7、9、11、13、および15、ならびに配列番号7、9、11、13、および15と少なくとも90%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第2のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型58を選択し、HPV血清型33に対してHPV血清型58を識別せず、

前記第2のプライマー／プローブのセットは、配列番号8、10、12、14、および16、ならびに配列番号8、10、12、14、および16と少なくとも90%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択される、

ことを特徴とする[13]に記載のプローブセット。

[23]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号38であり、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型59を識別するように構成され、前記第1のプライマー／プローブのセットまたは第2のプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、

前記プライマー／プローブのセットは、配列番号30～35、および配列番号30～35と少なくとも90%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第1のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型56を選択し、HPV血清型56に対してHPV血清型66を識別せず、

前記第1のプライマー／プローブのセットは、配列番号17、19および21、ならびに配列番号17、19および21と少なくとも90%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択され；

前記第2のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型66を選択し、HPV血清型56に対してHPV血清型66を識別せず、

前記第2のプライマー／プローブのセットは、配列番号18、20、22、および23、ならびに配列番号18、20、22、および23と少なくとも90%相同である配列からなる群から選択される配列のうちの少なくとも1つから選択される、

ことを特徴とする[13]に記載のプローブセット。

[24]

ヒトパピローマウイルス(HPV)の複数の血清型を検出するためのキットであって、該キットが、少なくとも3つのオリゴヌクレオチドプライマー／プローブのセットを備え、

そのセットの各々が、前記HPV生物の特定の血清型のための、検出可能な形で標識された、ヌクレオチド配列の長さが約10から約50である少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプローブと、各々のヌクレオチド配列の長さが約10から約150である少なくとも2つのオリゴヌクレオチドプライマーとを備え、

前記第1のプライマー／プローブのセットおよび第2のプライマー／プローブのセットは、互いに対して縮重しており、前記縮重プローブは各々、同じチャネルにおいて検出可能なシグナルを発するシグナル部分を有し、

前記第3のプライマー／プローブのセットは、前記他の2つのプライマー／プローブのセットに対して縮重しておらず、前記縮重プライマー／プローブのセットが優先的にアニーリングする血清型ではない第3の血清型を識別し、

10

20

30

40

50

前記第3のプライマー／プローブのセットは、前記縮重プライマー／プローブにおけるプローブのシグナル部分により発せられる波長と同じかまたは異なる波長のシグナルを発するシグナル部分を有する、
ことを特徴とするキット。

[2 5]

前記第1の縮重プライマー／プローブのセットおよび第2の縮重プライマー／プローブのセットについての、前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号36～38からなる群から選択されることを特徴とする[24]に記載のキット。

[2 6]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号36であり、

10

前記第1の縮重プライマー／プローブのセットは、配列番号1、3および5を含み、

前記第2の縮重プライマー／プローブのセットは、配列番号2、4および6を含むことを特徴とする[24]に記載のキット。

[2 7]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号37であり、

前記第1の縮重プライマー／プローブのセットは、配列番号7、配列番号15、ならびに配列番号9、11、および13のうちの1つを含み、

前記第2の縮重プライマー／プローブのセットは、配列番号8、配列番号15、ならびに配列番号10、12、および14のうちの1つを含む、

ことを特徴とする[24]に記載のキット。

20

[2 8]

前記縮重プライマー／プローブのセットの標的は、配列番号38であり、

前記第1の縮重プライマー／プローブのセットは、配列番号17、19および21を含み、

前記第2の縮重プライマー／プローブのセットは、配列番号18、配列番号20、ならびに配列番号22および23のうちの1つを含む、

ことを特徴とする[24]に記載のキット。

[2 9]

前記第3のプライマー／プローブのセットは、配列番号24～26、配列番号27～29、配列番号30～32、および配列番号33～35からなる群から選択されることを特徴とする[24]に記載のキット。

30

[3 0]

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型51を識別し、配列番号24～26および配列番号27～29からなる群から選択されることを特徴とする[29]に記載のキット。

[3 1]

前記第3のプライマー／プローブのセットは、HPV血清型59を識別し、配列番号30～32および配列番号33～35からなる群から選択されることを特徴とする[29]に記載のキット。

40

[3 2]

前記第3のプライマー／プローブのセットの検出プローブの前記シグナル部分は、前記第1のプライマー／プローブのセットおよび前記第2のプライマー／プローブのセットの検出プローブにより発せられる波長と同じ波長を発することを特徴とする[29]に記載のキット。

[3 3]

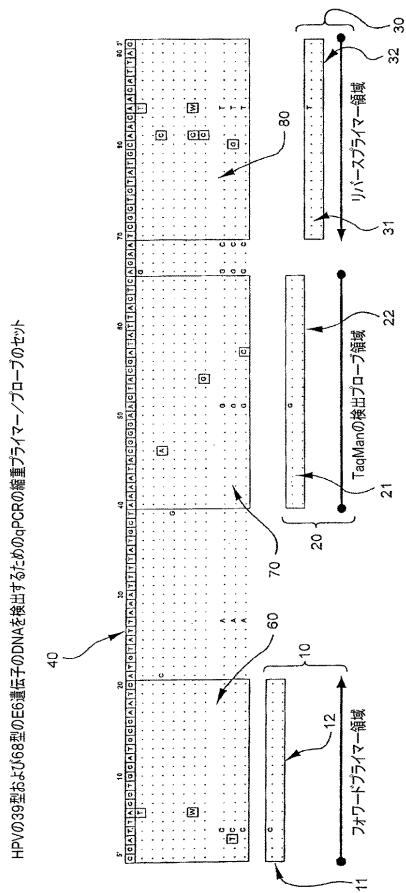
前記第3のプライマー／プローブのセットの検出プローブの前記シグナル部分は、前記第1のプライマー／プローブのセットおよび前記第2のプライマー／プローブのセットの検出プローブにより発せられる波長と異なる波長を発することを特徴とする[29]に記載のキット。

【 0 0 9 5 】

50

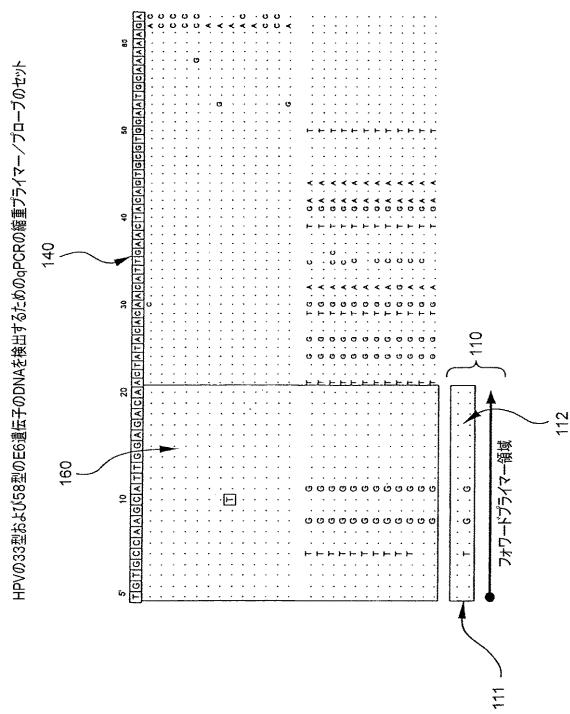
本明細書では、特定の実施形態との関係で本発明を説明してきたが、これらの実施形態は、本明細書で説明される本発明の原理および適用を例示するだけのものであることを理解されたい。したがって、これらの実施形態には、多くの改変を行うことができ、添付の特許請求の範囲により規定される、本明細書で説明される本発明の精神および範囲から逸脱しない限りにおいて、他の配置も考案しうることを理解されたい。

【図1】



HPVの39型および58型のE6遺伝子のDNAを検出すためのqPCRの縮短プライマー/プローブのセット

【図2 A】



HPVの33型および58型のE6遺伝子のDNAを検出すためのqPCRの縮短プライマー/プローブのセット

フロントページの続き

(72)発明者 チェン チー

アメリカ合衆国 21093 メリーランド州 コッキーズビル シダー ツリー コート 4
アパートメント ケー

(72)発明者 ヒュー ジェイ. ペック

アメリカ合衆国 21084 メリーランド州 ジャレッツビル ロックス クローム ヒル ロード 3213

(72)発明者 マイケル ポーター

アメリカ合衆国 21231 メリーランド州 ボルティモア サウス ダンカン ストリート 417

(72)発明者 グレゴリー エ. リチャート

アメリカ合衆国 21093 メリーランド州 ティモニアム イースト パドニア ロード 8
4 アパートメント 301

(72)発明者 レイ エ. マクミリアン

アメリカ合衆国 21093 メリーランド州 ティモニアム ライスター ドライブ 714

審査官 長部 喜幸

(56)参考文献 特表2005-500856 (JP, A)

国際公開第2009/057993 (WO, A1)

特表2006-500952 (JP, A)

欧州特許出願公開第01997914 (EP, A1)

Agnetha JOSEFSSON, Journal of Clinical Microbiology, 1999年, Vol.37, No.3, Pages 490-496

Nathalie YLITALO, Journal of Clinical Microbiology, 1995年, Vol.33, No.7, Pages 1822-1828

Francesco BROCCOLO, Journal of Virological Methods, 2008年, Vol.148, Pages 48-57

Martin MOBERG, Journal of Clinical Microbiology, 2003年, Vol.41, No.7, Pages 3221-3228

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)