

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成24年12月13日(2012.12.13)

【公表番号】特表2012-507293(P2012-507293A)

【公表日】平成24年3月29日(2012.3.29)

【年通号数】公開・登録公報2012-013

【出願番号】特願2011-534663(P2011-534663)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 A

C 12 Q 1/68 Z N A A

【手続補正書】

【提出日】平成24年10月25日(2012.10.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号：69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95または96によってコードされる配列を含む、ヒトパピローマウイルス(HPV)に対する単離した遺伝子マーカーを含む組成物。

【請求項2】

配列番号：69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95または96の相補的配列を含む組成物。

【請求項3】

配列番号：69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、または85によってコードされる配列を含む、高リスクのヒトパピローマウイルス(HPV)に対する単離した遺伝子マーカーを含む組成物。

【請求項4】

配列番号：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15による配列によってコードされるオリゴヌクレオチドを含む組成物。

【請求項5】

配列番号：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15の相補的配列を含む組成物。

【請求項6】

HPVのE1遺伝子に対して相同な配列を含む、ヒトパピローマウイルス(HPV)に対する単離した遺伝子マーカーを含む組成物。

【請求項7】

前記配列がHPVのE1遺伝子のヌクレオチド987～1135を含む、請求項6に記載の組成物。

【請求項8】

前記配列が配列番号：69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、

79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95または96によってコードされる、請求項6に記載の組成物。

【請求項9】

前記配列がHPVのE1遺伝子に対して少なくとも70%同一である、請求項6または7に記載の組成物。

【請求項10】

前記配列がHPVのE1遺伝子に対して少なくとも70%相同である、請求項6または7に記載の組成物。

【請求項11】

患者からの尿サンプルにおけるHPVのE1遺伝子の1つ以上の配列を、該患者におけるヒトパピローマウイルス(HPV)感染の指標とする方法であって、該尿サンプルにおいてHPVのE1遺伝子の1つ以上の配列を検出する工程を含み、HPVのE1遺伝子の1つ以上の配列を検出することが、少なくとも1つのヒトパピローマウイルスの存在を示し、それによって該患者におけるHPV感染を示す、方法。

【請求項12】

前記核酸がDNAである、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記DNAが経腎臓性DNAである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記検出工程が、ハイブリダイゼーション；ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)；ネステッドプライマーPCR；リアルタイムPCR；NAハイブリダイゼーション；サイクリックプロープ反応；一本鎖高次構造多型(SSCP)；鎖置換増幅(STA)；および制限断片長多型(RFLP)からなる群から選択される技術を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項15】

前記検出工程が、HPVのE1遺伝子中の配列とハイブリダイズするのに十分に相補的なプライマーの対を使用するポリメラーゼ連鎖反応を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項16】

前記検出工程が、配列番号：69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95または96によってコードされる配列とハイブリダイズするのに十分に相補的なプライマーの対を使用するポリメラーゼ連鎖反応を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項17】

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、配列番号：41および42のプライマーの対を使用する、請求項15または16に記載の方法。

【請求項18】

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、以下の配列番号：43と55、44と56、45と30、46と57、47と58、48と33、49と34、50と36、51と59、52と38、53と39、または54と40によってコードされるプライマーの対の少なくとも1つを使用する、請求項16または17に記載の方法。

【請求項19】

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、配列番号：43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、および54からなる群から選択される少なくとも1つの正方向プライマー、ならびに配列番号：55、56、30、57、58、33、34、35、36、59、38、39、および40からなる群から選択される少なくとも1つの逆方向プライマーを使用する、請求項16または17に記載の方法。

【請求項20】

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、以下の配列番号：43と55、44と56、45と30、46と57、48と33、50と36、51と59、および52と38によってコードさ

れるプライマーの対の少なくとも 1 つを使用する、請求項 1 6 または 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、配列番号：4 3、4 4、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 1、5 2、および 5 4 からなる群から選択される少なくとも 1 つの正方向プライマー、ならびに配列番号：5 5、5 6、3 0、5 7、5 8、3 3、3 5、3 6、5 9、3 8、および 3 9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの逆方向プライマーを使用する、請求項 1 6 または 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記尿サンプルにおける核酸分解を減少させる、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

核酸分解を減少させることが、上昇させた pH、増大させた塩濃度、熱不活性化によって、または前記尿サンプルを、エチレンジアミン四酢酸、グアニジン H C I、グアニジンイソチオシアネート、N - ラウロイルサルコシン、およびドデシル硫酸ナトリウムからなる群から選択される化合物で処理することによって、ヌクレアーゼ活性を阻害することを含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記検出工程が、前記尿サンプル中の前記核酸を実質的に単離する工程を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記単離が、沈降によるまたは固形吸着物質を用いることによるものである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

夾雑物を除去するために前記尿サンプルを濾過する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記濾過によって、約 1 0 0 0 超のヌクレオチドを含む核酸が除去される、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記濾過によって、約 3 0 0 超のヌクレオチドを含む核酸が除去される、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記核酸を定量化する工程をさらに含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 7】

具体的には、本発明は、配列番号：6 9、7 0、7 1、7 2、7 3、7 4、7 5、7 6、7 7、7 8、7 9、8 0、8 1、8 2、8 3、8 4、8 5、8 6、8 7、8 8、8 9、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5 または 9 6 によってコードされる配列を含むヒトパピローマウイルス (H P V) に対する単離した遺伝子マーカーを含む組成物を提供する。あるいは、または加えて、本発明は、配列番号：6 9、7 0、7 1、7 2、7 3、7 4、7 5、7 6、7 7、7 8、7 9、8 0、8 1、8 2、8 3、8 4、8 5、8 6、8 7、8 8、8 9、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5 または 9 6 の相補的配列を含む組成物を提供する。好ましい態様において、本発明は、配列番号：6 9、7 0、7 1、7 2、7 3、7 4、7 5、7 6、7 7、7 8、7 9、8 0、8 1、8 2、8 3、8 4、または 8 5 によってコードされる配列を含有する高リスクのヒトパピローマウイルス (H P V) に対する単離した遺伝子マーカーを含む組成物を提供する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

さらに本発明は、HPVのE1遺伝子に対して相同な配列を含むヒトパピローマウイルス(HPV)に対する単離した遺伝子マーカーを含む組成物を提供する。一態様において、当該配列はHPVのE1遺伝子のヌクレオチド987～1135を含む。別の態様において、当該配列は配列番号：69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95または96によってコードされる。本発明は、HPVのE1遺伝子に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%同一である、またはその間の任意のパーセンテージポイントである配列を包含する。好ましい実施形態において、当該配列はHPVのE1遺伝子に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%相同である、またはその間の任意のパーセンテージポイントである配列を包含する。好ましい実施形態において、当該配列はHPVのE1遺伝子に対して少なくとも70%相同である。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

当該検出工程は、HPVのE1遺伝子中の配列とハイブリダイズするのに十分に相補的なプライマーの対を使用するポリメラーゼ連鎖反応を含む。さらに、当該検出工程は、配列番号：69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95または96によってコードされる配列とハイブリダイズするのに十分に相補的なプライマーの対を使用するポリメラーゼ連鎖反応を含む。あるいは、または加えて、当該検出工程は、配列番号：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15によってコードされる配列、あるいはその相補的な配列とハイブリダイズするのに十分に相補的なプライマーの対を使用するポリメラーゼ連鎖反応を含む。本明細書に記載される方法がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づく方法を用いてHPVを検出する場合、当該ポリメラーゼ連鎖反応は配列番号：41および42のプライマーの対を使用する。配列番号：41および42のプライマーの対は、高リスク形態のHPVを分別して検出する。あるいは、当該ポリメラーゼ連鎖反応は、以下の配列番号：43と55、44と56、45と30、46と57、47と58、48と33、49と34、50と36、51と59、52と38、53と39、または54と40によってコードされるプライマーの対の少なくとも1つを使用する。ある実施形態において、当該ポリメラーゼ連鎖反応は、配列番号：43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、および54からなる群から選択される少なくとも1つの正方向プライマー、ならびに配列番号：55、56、30、57、58、33、34、35、36、59、38、39、および40からなる群から選択される少なくとも1つの逆方向プライマーを使用する。当該ポリメラーゼ連鎖反応は、さらに、以下の配列番号：43と55、44と56、45と30、46と57、48と33、50と36、51と59、および52と38によってコードされるプライマーの対の少なくとも1つを使用する。ある態様において、当該ポリメラーゼ連鎖反応は、配列番号：43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、および54からなる群から選択される少なくとも1つの正方向プライマー

、ならびに配列番号：55、56、30、57、58、33、35、36、59、38、および39からなる群から選択される少なくとも1つの逆方向プライマーを使用する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

またこの方法は、前記核酸を定量化する工程をさらに含めている。定量化は、当該技術分野において既知の方法によって達成される。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

配列番号：69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、または97によってコードされる配列を含む、ヒトパピローマウイルス(HPV)に対する単離した遺伝子マーカーを含む組成物。

(項目2)

配列番号：69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、または97の相補的配列を含む組成物。

(項目3)

配列番号：69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、または85によってコードされる配列を含む、高リスクのヒトパピローマウイルス(HPV)に対する単離した遺伝子マーカーを含む組成物。

(項目4)

配列番号：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15による配列によってコードされるオリゴヌクレオチドを含む組成物。

(項目5)

配列番号：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15の相補的配列を含む組成物。

(項目6)

HPVのE1遺伝子に対して相同な配列を含む、ヒトパピローマウイルス(HPV)に対する単離した遺伝子マーカーを含む組成物。

(項目7)

前記配列がHPVのE1遺伝子のヌクレオチド987～1135を含む、項目6に記載の組成物。

(項目8)

前記配列が配列番号：69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、または97によってコードされる、項目6に記載の組成物。

(項目9)

前記配列がHPVのE1遺伝子に対して少なくとも70%同一である、項目6または7に記載の組成物。

(項目10)

前記配列がHPVのE1遺伝子に対して少なくとも70%相同である、項目6または7に記載の組成物。

(項目11)

患者におけるヒトパピローマウイルス(HPV)感染を診断する方法であって、
(a)該患者から尿サンプルを入手する工程；および

(b) 該尿サンプルにおいて H P V の E 1 遺伝子の 1 つ以上の配列を検出する工程 ; を含み、 H P V の E 1 遺伝子の 1 つ以上の配列を検出することが、少なくとも 1 つのヒトパピローマウイルスの存在を示し、それによって患者における H P V 感染を診断する、方法。

(項目 12)

前記核酸が D N A である、項目 11 に記載の方法。

(項目 13)

前記 D N A が経腎臓性 D N A である、項目 12 に記載の方法。

(項目 14)

前記検出工程が、ハイブリダイゼーション；ポリメラーゼ連鎖反応(P C R)；ネステッドプライマー P C R ；リアルタイム P C R ； N A ハイブリダイゼーション；サイクリックプロープ反応；一本鎖高次構造多型(S S C P)；鎖置換増幅(S T A)；および制限断片長多型(R F L P)からなる群から選択される技術を含む、項目 11 に記載の方法。

(項目 15)

前記検出工程が、 H P V の E 1 遺伝子中の配列とハイブリダイズするのに十分に相補的なプライマーの対を使用するポリメラーゼ連鎖反応を含む、項目 11 に記載の方法。

(項目 16)

前記検出工程が、配列番号： 6 9 、 7 0 、 7 1 、 7 2 、 7 3 、 7 4 、 7 5 、 7 6 、 7 7 、 7 8 、 7 9 、 8 0 、 8 1 、 8 2 、 8 3 、 8 4 、 8 5 、 8 6 、 8 7 、 8 8 、 8 9 、 9 0 、 9 1 、 9 2 、 9 3 、 9 4 、 9 5 、 9 6 、または 9 7 によってコードされる配列とハイブリダイズするのに十分に相補的なプライマーの対を使用するポリメラーゼ連鎖反応を含む、項目 11 に記載の方法。

(項目 17)

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、配列番号： 4 1 および 4 2 のプライマーの対を使用する、項目 15 または 16 に記載の方法。

(項目 18)

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、以下の配列番号： 4 3 と 5 5 、 4 4 と 5 6 、 4 5 と 3 0 、 4 6 と 5 7 、 4 7 と 5 8 、 4 8 と 3 3 、 4 9 と 3 4 、 5 0 と 3 6 、 5 1 と 5 9 、 5 2 と 3 8 、 5 3 と 3 9 、または 5 4 と 4 0 によってコードされるプライマーの対の少なくとも 1 つを使用する、項目 16 または 17 に記載の方法。

(項目 19)

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、配列番号： 4 3 、 4 4 、 4 5 、 4 6 、 4 7 、 4 8 、 4 9 、 5 0 、 5 1 、 5 2 、 5 3 、および 5 4 からなる群から選択される少なくとも 1 つの正方向プライマー、ならびに配列番号： 5 5 、 5 6 、 3 0 、 5 7 、 5 8 、 3 3 、 3 4 、 3 5 、 3 6 、 5 9 、 3 8 、 3 9 、および 4 0 からなる群から選択される少なくとも 1 つの逆方向プライマーを使用する、項目 16 または 17 に記載の方法。

(項目 20)

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、以下の配列番号： 4 3 と 5 5 、 4 4 と 5 6 、 4 5 と 3 0 、 4 6 と 5 7 、 4 8 と 3 3 、 5 0 と 3 6 、 5 1 と 5 9 、および 5 2 と 3 8 によってコードされるプライマーの対の少なくとも 1 つを使用する、項目 16 または 17 に記載の方法。

(項目 21)

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、配列番号： 4 3 、 4 4 、 4 5 、 4 6 、 4 7 、 4 8 、 4 9 、 5 0 、 5 1 、 5 2 、および 5 4 からなる群から選択される少なくとも 1 つの正方向プライマー、ならびに配列番号： 5 5 、 5 6 、 3 0 、 5 7 、 5 8 、 3 3 、 3 5 、 3 6 、 5 9 、 3 8 、および 3 9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの逆方向プライマーを使用する、項目 16 または 17 に記載の方法。

(項目 22)

前記尿サンプルにおける核酸分解を減少させる、項目 11 に記載の方法。

(項目 23)

核酸分解を減少させることができ、上昇させた pH 、増大させた塩濃度、熱不活性化によって

、または前記尿サンプルを、エチレンジアミン四酢酸、グアニジンHCl、グアニジンイソチオシアネット、N-ラウロイルサルコシン、およびドデシル硫酸ナトリウムからなる群から選択される化合物で処理することによって、ヌクレアーゼ活性を阻害することを含む、項目22に記載の方法。

(項目24)

工程(b)が、前記尿サンプル中の前記核酸を実質的に単離する工程を含む、項目11に記載の方法。

(項目25)

前記単離が、沈降によるまたは固形吸着物質を用いることによるものである、項目24に記載の方法。

(項目26)

夾雑物を除去するために前記尿サンプルを濾過する工程をさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目27)

前記濾過によって、約1000超のヌクレオチドを含む核酸が除去される、項目26に記載の方法。

(項目28)

前記濾過によって、約300超のヌクレオチドを含む核酸が除去される、項目26に記載の方法。

(項目29)

前記核酸を定量化する工程をさらに含む、項目11に記載の方法。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

【表1】
表1. 高リスクおよび低リスクのHPV遺伝子型に対するE1遺伝子の部分のDNA配列の
多重アラインメント

配列番号	配列
69	15-151
70	15-152
71	15-153
72	15-154
73	15-155
74	15-156
75	15-157
76	15-158
77	15-159
78	15-160
79	15-161
80	15-162
81	15-163
82	15-164
83	15-165
84	15-166
85	15-167
86	15-168
87	15-169
88	15-170
89	15-171
90	15-172
91	15-173
92	15-174
93	15-175
94	15-176
95	15-177
96	15-178

本発明の実施に有用な核酸操作のための技術には、Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed., Vol. 1 - 3, eds. Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)；およびCurrent Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubelら、Greene Publishing and Wiley-Interscience : New York (1987)、ならびに定期的に更新したものが含まれるが、これに制限されない様々な参考文献に記載されている。特定の記載は、本発明の範囲を制限することを意図するものでは

ないが、本発明のある態様を実施する際に指針を提供する。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 3】

【表6】

表6.

<u>プライマー</u>	<u>配列</u>	<u>配列番号</u>
XEN-HPV-FAM-F	5'-FAM-CAG GCA GAA TTA GAG RCA GC-3'	97
XEN-HPV-F	5'-CAG GCA GAA TTA GAG RCA GC-3'	98
XEN-HPV-R	5'-TCC ACC ACA WAC TTT CGT TTT A-3'	99
MY09	5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3'	100
MY11	5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3'	101
GP5+	5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3'	102
GP6+	5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'	103

結果

計320の尿サンプルを、対応する子宮頸部試料のh c 2 アッセイおよび細胞診検査の結果と比較するために、X en o m i c s の C E アッセイによって分析した。h c 2 に関する比較の結果を表7に示す。一致率は248 / 320 (77.5%)であった。320の尿サンプルのうち、72は適合させた子宮頸部試料のh c 2 アッセイと不一致の結果を出し、D N A シークエンシングによってさらに検証された。