

【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29年12月28日(2017.12.28)

【公表番号】特表2016-537030(P2016-537030A)  
 【公表日】平成28年12月1日(2016.12.1)  
 【年通号数】公開・登録公報2016-066  
 【出願番号】特願2016-553749(P2016-553749)  
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 Q 1/68 Z

C 1 2 Q 1/04

【手続補正書】

【提出日】平成29年11月14日(2017.11.14)

【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】

(a) プラスモジウム属原虫を含むサンプルを準備する工程、及び  
 (b) 前記サンプル中の変異型K-13プロペラ核酸又はタンパク質の存在を検出する工程  
 を含む、プラスモジウム属原虫を遺伝子型決定する方法。

【請求項2】

(a) 患者由来の血液サンプルを準備する工程、及び  
 (b) 前記血液サンプル中の野生型又は変異型K-13プロペラ核酸又はタンパク質の有無を  
 検出する工程  
 を含む、患者のプラスモジウム属原虫感染を検出する方法。

【請求項3】

前記プラスモジウム属原虫が熱帯熱マラリア原虫である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記サンプル中の変異型K-13プロペラ核酸の存在がシーケンシングにより検出される、  
 及び/又はPCRにより検出される、請求項1又は3に記載の方法。

【請求項5】

前記サンプル中の変異型K-13プロペラ核酸の存在又は野生型K-13プロペラ核酸の存在が、  
 シーケンシングにより検出される、及び/又はPCRにより検出される、請求項2又は3に  
 記載の方法。

【請求項6】

前記プラスモジウム属原虫が野生型のK-13プロペラ核酸若しくはタンパク質配列を有す  
 るか、又は変異型のK-13プロペラ核酸若しくはタンパク質配列を有するかを判定する工程  
 を含む、請求項2～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

K-13プロペラ核酸の変異が、K-13プロペラタンパク質内のアミノ酸残基の違いをもたらす非同義的SNPであり、前記非同義的SNPが、以下：

【表 1】

F446I	ttt/att
G449A	ggt/gct
N458Y	aat/tat
C469Y	tgc/tac
W470stop	tgg/tga
A481V	gct/gtt
Y493H	tac/cac
K503N	aag/aat
S522C	agt/tgt
V534A	gtt/gct
R539T	aga/aca
I543T	att/act
G548D	ggc/gac
P553L	ccg/ctg
V555A	gta/gca
A557S	gca/tca
R561H	cgt/cat
K563R	aaa/aga
V568G	gtg/ggg
P574L	cct/ctt
A578S	gct/tct
C580Y	tgt/tat
F583L	ttt/tta/g
D584V	gat/gtt
V589I	gtc/atc
Q613E	caa/gaa
D641G	gat/ggt

のうちの1つである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

K-13プロペラ核酸を増幅するためのプライマー及び増幅産物を検出するための試薬を含む、プラスモジウム属原虫感染を検出するためのキット。

【請求項 9】

変異型K-13プロペラ核酸を検出するためのプローブを含み、前記プローブが、蛍光標識

、放射性標識、又は酵素標識で標識されていてもよい、請求項8に記載のキット。

【請求項 1 0】

Y493H、R539T、I543T、及びC580Yアレルをコードする変異型K-13プロペラ核酸を検出する、請求項8又は9に記載のキット。

【請求項 1 1】

少なくとも1個の以下のプライマー

5'-cggagtgaccaaactctggga-3' (配列番号：9)、  
 5'-gggaatctgggtggtaacagc-3' (配列番号：10)、  
 5'-cgccagcattgttgactaat-3' (配列番号：11)、  
 5'-gcggaagtagtagcgagaat-3' (配列番号：12)、  
 5'-gccaagctgccattcatttg-3' (配列番号：13)、及び  
 5'-gccttggtgaaagaagcaga-3' (配列番号：14)

を含む、請求項8～10のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 1 2】

F446I、N458Y、C469Y、Y493H、K503N、R539T、I543T、P553L、P574L、A578S、C580Y、及びD584Vアレルをコードする変異型K13プロペラ核酸を検出する、請求項8～11のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 1 3】

F446I、G449A、N458Y、C469Y、W470stop、A481V、Y493H、K503N、S522C、V534A、R539T、I543T、G548D、P553L、V555A、A557S、R561H、K563R、V568G、P574L、A578S、C580Y、F583L、D584V、V589I、Q613E、及びD641Gアレルをコードする変異型K13プロペラ核酸を検出する、請求項8～12のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 1 4】

少なくとも1組の以下のプライマーの対

ペアPCR1

5' AGGTGGATTTGATGGTGTAGAAT 3' (フォワード) (配列番号：15)  
 5' CATAACCTCAGTTTCAAATAAAGC 3' (リバース) (配列番号：16)

ペアPCR2

5' AATTTCTTATACGTTTTTGGTGGTAA 3' (フォワード) (配列番号：17)  
 5' CTCTACCCATGCTTTCATACGAT 3' (リバース) (配列番号：18)

ペアPCR3

5' GGATATGATGGCTCTTCTATTATACCG 3' (フォワード) (配列番号：19)  
 5' ACTTCAATAGAATTTAATCTCTCACCA 3' (リバース) (配列番号：20)

ペアPCR4

5' ATGTCATTGGTGGAACTAATGGT 3' (フォワード) (配列番号：21)  
 5' TTAATGGTTGATATTGTTCAACG 3' (リバース) (配列番号：22)

ペアPCR5

5' TTCAGGAGCAGCTTTTAATTACC 3' (フォワード) (配列番号：23)  
 5' CTGGTGAAAAGAAATGACATGAA 3' (リバース) (配列番号：24)

ペアPCR6

5' CCTTGTGAAAAGAAGCAGAATTT 3' (フォワード) (配列番号：25)  
 5' ATTCAATACAGCACTTCCAAAATAA 3' (リバース) (配列番号：26)

を含む、請求項8～13のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 1 5】

以下のSNPの1つとハイブリダイズする少なくとも1個のプロープを含む、請求項8～14のいずれか一項に記載のキット。

【表 2】

•	F446I	ttt/att
•	G449A	ggt/gct
•	N458Y	aat/tat
•	C469Y	tgc/tac
•	W470stop	tgg/tga
•	A481V	gct/gtt
•	Y493H	tac/cac
•	K503N	aag/aat
•	S522C	agt/tgt
•	V534A	gtt/gct
•	R539T	aga/aca
•	I543T	att/act
•	G548D	ggc/gac
•	P553L	ccg/ctg
•	V555A	gta/gca
•	A557S	gca/tca
•	R561H	cgt/cat
•	K563R	aaa/aga
•	V568G	gtg/ggg
•	P574L	cct/ctt
•	A578S	gct/tct
•	C580Y	tgt/tat
•	F583L	ttt/tta/g
•	D584V	gat/gtt
•	V589I	gtc/atc
•	Q613E	caa/gaa
•	D641G	gat/ggt.

## 【請求項 16】

- a) プラスモジウム属原虫のDNAを含む生体サンプルを準備する工程、
- b) 場合により前記生体サンプルからDNAを抽出する工程、
- c) プラスモジウム属原虫のDNAを、100 bp ~ 300 bpの範囲の距離においてK13プロベラ核酸と特異的にハイブリダイズする少なくとも一組のプライマーと接触させ、インターカレート染料の存在下でPCR反応を行う工程、
- d) 増幅産物を融解ステップに供する工程、
- e) 前記増幅産物の融解プロファイルを解析することにより変異型アレル又は野生型ア

レルの存在を判定する工程

を含む、プラスモジウム属原虫を含む生体サンプルにおいて野生型K13プロペラ核酸又は変異型K13プロペラ核酸の存在を検出するための方法であって、

f) F446I、G449A、N458Y、C469Y、W470stop、A481V、Y493H、K503N、S522C、V534A、R539T、I543T、G548D、P553L、V555A、A557S、R561H、K563R、V568G、P574L、A578S、C580Y、F583L、D584V、V589I、Q613E、及びD641Gアレルをコードする変異型K13プロペラ核酸を検出する工程をさらに含んでもよい、方法。

【請求項17】

検出されるK-13プロペラ核酸の変異が非同義的SNPであり、前記非同義的SNPが、以下：

【表 3】

F446I	ttt/att
G449A	ggt/gct
N458Y	aat/tat
C469Y	tgc/tac
W470stop	tgg/tga
A481V	gct/gtt
Y493H	tac/cac
K503N	aag/aat
S522C	agt/tgt
V534A	gtt/gct
R539T	aga/aca
I543T	att/act
G548D	ggc/gac
P553L	ccg/ctg
V555A	gta/gca
A557S	gca/tca
R561H	cgt/cat
K563R	aaa/aga
V568G	gtg/ggg
P574L	cct/ctt
A578S	gct/tct
C580Y	tgt/tat
F583L	ttt/tta/g
D584V	gat/gtt
V589I	gtc/atc
Q613E	caa/gaa
D641G	gat/ggt

のうちの1つである、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

変異型K13プロペラ核酸をPCR反応により増幅する工程及び増幅した核酸を変異型K13プロペラに特異的なプローブと接触させる工程を含む、プラスモジウム属原虫を含む生体サンプルにおいて変異型K13プロペラ核酸の存在を検出するための方法であって、前記増幅する工程を、少なくとも1個の以下のプライマー

5'-cggagtgaccaaactctggga-3' (配列番号：9)、

5'-gggaatctggtggtaacagc-3' (配列番号：10)、

5'-cgccagcattgttgactaat-3' (配列番号：11)、  
5'-gcggaagtagtagcgagaat-3' (配列番号：12)、  
5'-gccaaagctgccattcatttg -3' (配列番号：13)、及び  
5'-gccttgttgaaagaagcaga -3' (配列番号：14)  
を用いて行ってもよい、方法。

【請求項 19】

変異型K13プロペラ核酸又はタンパク質の存在が、前記患者がアルテミシニン誘導体耐性のプラスモジウム属原虫に感染していることを示す、請求項2に記載の方法。

【請求項 20】

アルテミシニン誘導体耐性のプラスモジウム属原虫に感染している前記患者に、通常のプロトコルよりも長期のアルテミシニン誘導体に基づく治療を施す工程及び/又は別の抗マラリア薬、好ましくはキニーネ、クロロキン、又はメフロキンを投与する工程をさらに含む、請求項19に記載の方法。

【請求項 21】

アルテミシニン誘導体耐性のプラスモジウム属原虫に感染している前記患者に、新規抗マラリア薬に基づく治療を施す工程、及び前記治療の施行後に請求項2に規定する工程a)及びb)を繰り返す工程をさらに含み、変異型K13プロペラ核酸又はタンパク質が存在しないことが、前記患者がもはやアルテミシニン誘導体耐性のプラスモジウム属原虫に感染していないこと、及び前記治療がアルテミシニン誘導体耐性のプラスモジウム属原虫に対して有効であることを示す、請求項19に記載の方法。

【請求項 22】

前記プローブが蛍光ビーズに結合している、請求項18に記載の方法。

【請求項 23】

前記プローブを変異型K13プロペラドメイン核酸に結合させる工程、及び前記結合したK13プロペラドメイン核酸を、前記結合したK13プロペラドメイン核酸に結合する第二のプローブを用いて検出する工程をさらに含む、請求項22に記載の方法。