

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7677950号
(P7677950)

(45)発行日 令和7年5月15日(2025.5.15)

(24)登録日 令和7年5月7日(2025.5.7)

(51)国際特許分類 F I
 C 1 2 Q 1/70 (2006.01) C 1 2 Q 1/70
 C 1 2 Q 1/6888(2018.01) C 1 2 Q 1/6888 Z Z N A

請求項の数 15 (全59頁)

(21)出願番号	特願2022-513303(P2022-513303)	(73)特許権者	591003013
(86)(22)出願日	令和2年2月24日(2020.2.24)		エフ・ホフマン - ラ ロシュ アーゲー
(65)公表番号	特表2022-546443(P2022-546443 A)		F . HOFFMANN - LA ROCH E AKTIENGESELLSCHA FT
(43)公表日	令和4年11月4日(2022.11.4)		スイス・シーエイチ - 4 0 7 0 パーゼル ・グレンツアーヘルストラツセ 1 2 4
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/054715	(74)代理人	100099759
(87)国際公開番号	WO2021/037399		弁理士 青木 篤
(87)国際公開日	令和3年3月4日(2021.3.4)	(74)代理人	100123582
審査請求日	令和5年2月22日(2023.2.22)		弁理士 三橋 真二
(31)優先権主張番号	62/892,132	(74)代理人	100117019
(32)優先日	令和1年8月27日(2019.8.27)		弁理士 渡辺 陽一
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100141977
			弁理士 中島 勝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 c c c DNA から転写された H B V RNA を含む、B 型肝炎ウイルス RNA の増幅および検出のための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中の B 型肝炎ウイルス (H B V) RNA の 1 つまたは複数の標的核酸を検出する方法であって、

(a) 核酸サンプルを提供することと、

(b) H B V RNA の前記 1 つまたは複数の標的核酸が核酸サンプル中に存在する場合、増幅産物を産生するために、核酸サンプルを 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドおよび 1 つまたは複数のプライマーセットおよび核酸ポリメラーゼと接触させることを含む増幅工程を実施することであって、前記 1 つまたは複数のプライマーセットは、1 つまたは複数のフォワードプライマーと、リバースプライマーとしても機能する 1 つまたは複数の逆転写 (R T) プライマーとを含む、増幅工程を実施すること、

(c) H B V RNA の前記 1 つまたは複数の標的核酸がサンプル中に存在する場合、前記増幅産物を 1 つまたは複数のプローブと接触させることを含む、ハイブリダイゼーション工程を実施すること、および

(d) 前記増幅産物の存在または非存在を検出することであって、前記増幅産物の存在は、前記サンプル中の H B V RNA の前記 1 つまたは複数の標的核酸の存在を示し、前記増幅産物の非存在は、前記サンプル中の H B V RNA の前記 1 つまたは複数の標的核酸の非存在を示す、検出することを含む、検出工程を実施することを含む、

ここで、H B V RNA の前記 1 つまたは複数の標的核酸がポリ A テールを含み、

リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、HBV特異的配列を含み、そしてHBV RNAの前記1つまたは複数の標的核酸の前記ポリAテールに結合するためのポリT部分をさらに含み、

前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、非伸長性であり、そして前記サンプル中に存在し得る前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーのHBV特異的配列と相同な任意のHBV DNAにハイブリダイズし、それにより、前記サンプル中に存在し得る任意の相同HBV DNAへの前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーの結合を防止する、

方法。

【請求項2】

HBV RNAの前記1つまたは複数の標的核酸が、共有結合的に閉じた環状二本鎖DNA(cccDNA)に由来する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

HBV RNAの前記1つまたは複数の標的核酸が、HBVプレゲノムRNA(pgRNA)である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記サンプルが生物学的サンプルである、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

(i) 前記1つまたは複数のフォワードプライマーが、配列番号387の核酸配列を含み、

(ii) リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号34、35、43、94、96、112、116、117、119、121、123、124、141、142、151、152、153、154、155、157、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列を含み、

(iii) 前記1つまたは複数のプローブが、配列番号388の核酸配列またはその相補体を含み、かつ

(iv) 前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号1、2、3、4、5、9、10、11、14および15から選択される群の核酸配列を含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが2つの核酸配列を含み、前記2つの核酸配列が配列番号151および152の核酸配列を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列を含む1つの配列を含むか、または

リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号96の核酸配列を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列を含む1つの配列を含むか、または

リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが配列番号43の核酸配列を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号2の核酸配列を含む1つの配列を含むか、または

リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号96、112、116、および117から選択される群の1つまたは複数の核酸配列を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号2の核酸配列を含む1つの配列を含むか、または

リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号94、96、116、117、119、121、123、124、151、153、155、および157から選択される群の1つまたは複数の核酸配列を含み、か

10

20

30

40

50

つ前記 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号 11 の核酸配列を含む 1 つの配列を含むか、または

リバースプライマーとしても機能する前記 1 つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーが、配列番号 142、161、162、163、164、165、166、167、168、169、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および 190 から選択される群の 1 つまたは複数の核酸配列を含み、かつ前記 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号 11 の核酸配列を含む 1 つの配列を含むか、または

リバースプライマーとしても機能する前記 1 つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーが、配列番号 141、153、157、161、163、169、171、173、175、177、179、181、183、185、188、および 190 から選択される群の 1 つまたは複数の核酸配列を含み、かつ前記 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号 11 の核酸配列を含む 1 つの配列を含むか、または

リバースプライマーとしても機能する前記 1 つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーが、配列番号 35 の核酸配列を含み、かつ前記 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号 1、2、3、4、および 5 から選択される群の 1 つまたは複数の核酸配列を含むか、または

リバースプライマーとしても機能する前記 1 つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーが、配列番号 34 の核酸配列を含み、かつ前記 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号 2、9、10、11、および 14 から選択される群の 1 つまたは複数の核酸配列を含むか、または

リバースプライマーとしても機能する前記 1 つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーが、配列番号 151 の核酸配列を含み、かつ前記 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号 2、10、11、および 15 から選択される群の 1 つまたは複数の核酸配列を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ハイブリダイゼーション工程が、前記増幅産物を 1 つまたは複数の検出可能なプローブと接触させることを含み、前記 1 つまたは複数の検出可能なプローブが、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター部分によって標識されており、前記検出工程が、前記プローブの前記ドナー蛍光部分と前記アクセプター部分との間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の存在または非存在を検出することを含み、蛍光の存在または非存在が、前記サンプル中の HBV RNA の存在または非存在を示し、そして

前記ドナー蛍光部分および前記対応するアクセプター部分が、前記プローブ上で互いにわずか 8 ~ 20 ヌクレオチド以内にある、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記増幅工程が、5' から 3' ヌクレアーゼ活性を有する熱安定性核酸ポリメラーゼを用いる、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

サンプル中に存在し得る B 型肝炎ウイルス (HBV) RNA の 1 つまたは複数の標的核酸を検出するためのキットであって、

(a) 核酸ポリメラーゼ、

(b) ヌクレオシド三リン酸、

(c) 1 つまたは複数のフォワードプライマーおよびリバースプライマーとしても機能する 1 つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーを含む 1 つまたは複数のプライマーセット、

(d) 1 つまたは複数のプローブ、および

(e) 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドを含む増幅試薬を含み、ここで、HBV RNA の前記 1 つまたは複数の標的核酸がポリ A テールを含み、

リバースプライマーとしても機能する前記 1 つまたは複数の逆転写 (RT) プライマー

10

20

30

40

50

が、HBV特異的配列を含み、そしてHBV RNAの前記1つまたは複数の標的核酸の前記ポリAテールに結合するためのポリT部分をさらに含み、そして

前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、非伸長性であり、そして前記サンプル中に存在し得る前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーのHBV特異的配列と相同な任意のHBV DNAにハイブリダイズし、それにより、前記サンプル中に存在し得る任意の相同HBV DNAへの前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーの結合を防止する、キット。

【請求項10】

HBV RNAの前記1つまたは複数の標的核酸が、共有結合的に閉じた環状二本鎖DNA(cccDNA)に由来する、請求項9に記載のキット。

10

【請求項11】

HBV RNAの前記1つまたは複数の標的核酸が、HBVプレゲノムRNA(pgRNA)である、請求項10に記載のキット。

【請求項12】

(i) 前記1つまたは複数のフォワードプライマーが、配列番号387の核酸配列を含み、

(ii) リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号34、35、43、94、96、112、116、117、119、121、123、124、141、142、151、152、153、154、155、157、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列を含み、

20

(iii) 前記1つまたは複数のプローブが、配列番号388の核酸配列またはその相補体を含み、かつ

(iv) 前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号1、2、3、4、5、9、10、11、14、および15から選択される群の核酸配列を含む、請求項9から11のいずれか一項に記載のキット。

【請求項13】

リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが2つの核酸配列を含み、前記2つの核酸配列が配列番号151および152の核酸配列を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列を含む1つの配列を含むか、または

30

リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号96の核酸配列を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列を含む1つの配列を含むか、または

リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号43の核酸配列を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号2の核酸配列を含む1つの配列を含むか、または

リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号96、112、116、および117から選択される群の1つまたは複数の核酸配列を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号2の核酸配列を含む1つの配列を含むか、または

40

リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号94、96、116、117、119、121、123、124、151、153、155、および157から選択される群の1つまたは複数の核酸配列を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列を含む1つの配列を含むか、または

リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号142、161、162、163、164、165、166、167、16

50

8、169、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列を含む1つの配列を含むか、または

リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号141、153、157、161、163、169、171、173、175、177、179、181、183、185、188、および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列を含む1つの配列を含むか、または

10

リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号35の核酸配列を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号1、2、3、4および5から選択される群の1つまたは複数の核酸配列を含むか、または

リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号34の核酸配列を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号2、9、10、11および14から選択される群の1つまたは複数の核酸配列を含むか、または

リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号151の核酸配列を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号2、10、11および15から選択される群の1つまたは複数の核酸配列を含む、請求項12に記載のキット。

20

【請求項14】

前記1つまたは複数のプローブが、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター部分を含み、検出可能に標識され、そして

前記ドナー蛍光部分および前記対応するアクセプター部分が、プローブ上で互いにわずか8~20ヌクレオチド以内にある、請求項9から13のいずれか一項に記載のキット。

【請求項15】

核酸ポリメラーゼが、5'から3'ヌクレアーゼ活性を有する熱安定性ポリメラーゼ酵素である、請求項9から14のいずれか一項に記載のキット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、インビトロウイルス診断の分野に関する。この分野では、本発明は、相同ゲノムB型肝炎ウイルス(HBV)DNAの増幅および検出を防止するために、少なくとも1つの逆転写(RT)プライマーおよび少なくとも1つの競合的ブロックオリゴヌクレオチドを使用する、サンプル中に存在し得る標的核酸の増幅および検出、特に、HBV、特にHBV RNA(特に、HBVプレゲノムRNA(pgRNA)等の共有結合的に閉じた環状二本鎖DNA(cccDNA)に由来するHBV RNA)の配列変異および/または個々の変異を含む標的核酸の特異的増幅および検出に関する。本発明はさらに、循環HBV RNAの増幅および検出のための方法、オリゴヌクレオチド(逆転写(RT)プライマーおよび競合的ブロックオリゴヌクレオチドなど)を含む、反応混合物、およびキットを提供する。

40

【背景技術】

【0002】

肝炎は肝臓の炎症であり、肝臓に影響を及ぼすウイルス感染のファミリーによって引き起こされ得、最も一般的なタイプはA型肝炎、B型肝炎およびC型肝炎である。A型肝炎、B型肝炎およびC型肝炎は、3つの異なるウイルスによって引き起こされる疾患である。

【0003】

B型肝炎は、B型肝炎ウイルス(HBV)によって引き起こされる肝臓の感染症である

50

。HBVは、急性感染および/または慢性感染の両方を引き起こし得る。初期感染の間、多くの人々は無症候性であるが、一部の人々は疾患の急速な発症を示す（嘔吐、黄色がかった皮膚、疲労、暗色尿および腹痛を含む）。慢性B型肝炎は、出生前後の感染者に優先的に罹患する。慢性疾患を有するこれらの個人の大部分も無症候性であるが、最終的には肝硬変および肝臓癌を発症し得る。これらの合併症は、慢性疾患を有する人の15～25%の死亡をもたらす。HBVは、一般的に、例えば、HBVに感染した人由来の血液、精液、または他の体液が、感染していない人の体内に入る際に、感染性の血液または体液への曝露によって伝染する。これは、性的接触、注射針、注射器、または他の薬物注射機器の共有によって、または出産時に母親から赤ん坊に起こり得る。出生時付近の感染症または小児期の他の人々の血液との接触による感染症は、疾患が一般的な地域でB型肝炎を獲得する最も頻度が高い方法である。疾患がまれな地域では、静脈内薬物使用および性交が最も頻度の高い感染経路である。他の危険因子には、医療行為、輸血、透析、感染者との生活、感染率が高い国での旅行、および施設での生活が挙げられる。HBV感染は、曝露の30～60日後に診断することができる。次いで、診断は、通常、HBVウイルスの一部およびHBVウイルスに対する抗体について血液を試験することによって確認される。

10

【0004】

HBV感染は、1982年以来ワクチン接種によって予防可能である。世界保健機関（WHO）は、可能であれば、より長期間の保護を確実にするために必要なその後の用量での、生後1日のワクチン接種を推奨している。慢性B型肝炎の患者にはテノホビルまたはインターフェロン等の抗ウイルス薬が有用であり得るが、肝硬変の患者には肝移植が有用な場合がある。

20

【0005】

疾患を管理するために利用可能な治療法はあるが、治癒率は低い。治癒的療法がない場合、抗ウイルス薬への生涯にわたる遵守が必要である。治療を除去することによって、現在の治療では感染細胞核内のHBVエピソームゲノムのリザーバを直接標的化することができないため、HBV力価の揺り戻しが可能になることがしばしばである。

【0006】

HBVのウイルス生活環は、DNA形態とRNA形態との間で交互である。感染性HBV粒子は、不完全な二本鎖DNAゲノム（緩和環DNAまたはrcDNA）を含む。感染細胞では、HBV DNA複製が完了して、宿主細胞の核内に共有結合で閉じた環状二本鎖DNA（cccDNA）が形成される。このDNAゲノムからの転写によって、ウイルスの構造中のタンパク質（コアおよび表面タンパク質）、e抗原、ウイルスポリメラーゼ、およびX抗原をコードする様々なメッセンジャーRNA形態が生成される。プレゲノムRNA（pgRNA）として知られる1つのmRNA形態は、カプシド化された分泌ウイルス粒子中にrcDNAの新しいコピーを生成するウイルスポリメラーゼの逆転写活性の鋳型としても機能する。いくつかの根拠は、ある割合のカプシド化されたpgRNAが逆転写されることなく放出され、感染細胞の産生がrcDNAおよびpgRNA含有ウイルス粒子の両方を含むようになって示す。さらに、複数のスプライシングされたRNAバリエーションが存在し、その一部はまた、HBV DNAの不完全な形態に逆転写され、分泌される。HBVゲノムの宿主染色体への組み込みは、完全なpgRNA分子を産生することができないため、複製サイクルの一部ではないが、これは一般的に生じるものであり、表面抗原含有サブウイルス粒子の分泌に寄与する、より小さい、切断型または融合mRNAを産生する宿主細胞をもたらす得る。

30

40

【0007】

以下の表1は、HBVのcccDNAから生成されると考えられるHBV RNA形態のリストである。

50

【表 1】

種類/説明
コアおよびポリメラーゼタンパク質のmRNAでもある3.5kbプレゲノム (pg) RNA
5'末端においてpgRNAよりも長く、HBeAgを産生する3.5kbのプレコアmRNA
2.4kb mRNA、大きな(プレS1)表面タンパク質
2.1kb mRNA、中間(プレS2)および小(HB)表面タンパク質の2つの転写開始部位
0.7kb mRNA、HBx調節タンパク質
より短いX遺伝子転写物(後の転写開始部位/5'末端)
X遺伝子の二次3'末端部位(一次ポリA部位の上流)からの切断されたHBV mRNAは、cccDNAから転写される可能性があるが、主にcccDNAから転写されない可能性がある
スプライシングされたmRNA。
スプライシングされたpgRNAは、カプシド化されたスプライシングされたDNAを生成し得る。
保存された主要なスプライシングされた携帯、少数のスプライシングされた型は遺伝子型によって異なり得る
場合によって2つのアンチセンスRNA転写物
新規な転写開始部位(TSS)またはスプライス形態が発見され得る

10

表 1 : HBV の cccDNA から生成されると考えられる HBV RNA 形態

【0008】

以下の表 2 では、組み込まれたコピーから転写することができない(すなわち、排他的に cccDNA が起源である) HBV RNA の形態のリストである。

20

【表 2】

種類/説明
コアおよびポリメラーゼタンパク質のmRNAでもある3.5kbプレゲノム (pg) RNA
5'末端においてpgRNAよりも長く、HBeAgを産生する3.5kbのプレコアmRNA

表 2 : 組み込まれたコピーから転写することができない(排他的に cccDNA が起源である) HBV RNA の形態

【0009】

以下の表 3 では、組み込まれたコピーから転写し得る HBV RNA のいくつかの形態が示されている。

30

【表 3】

種類/説明
より短いmRNA (pgRNA またはプレコアmRNA ではない) - 組み込まれたHBVコピーのゲノムの切断部位に応じて、組み込まれたコピーは、より短いmRNA (例えば2.4kb、2.1kb、0.7kb または記載される他のバリエーション) の1つまたは複数を生産することができてもできなくてもよい。
X遺伝子の二次3'末端部位(一次ポリA部位の上流)からの組み込まれたHBVコピーからの切断されたHBV mRNA - cccDNA に使用される一次ポリA部位は、インタクトではないか、または組み込まれたコピーで使用されない可能性がある。
組み込まれたHBVコピーからのHBVおよび宿主配列の融合RNA産物(ヒトゲノムとの組み込み部位およびプロモーターの利用可能性に応じた可変構造 - そのような転写物の5'または3'末端のいずれかがヒト配列を含み得る可能性がある)

40

表 3 : 組み込まれたコピーから転写し得る HBV RNA のいくつかの形態。

【0010】

HBV のマーカーとしては、DNA、e 抗原(プレコアmRNA 由来)、コア抗原(またはe およびコアを含む抗原の組合せ)、およびs 抗原、ならびにこれらの抗原に対する抗体の対象/患者の産生の検出が挙げられる。s 抗原の抑制は、機能的治癒のためのマーカーである。しかしながら、s 抗原は、HBV の組み込まれた非複製コピーによって産生され得るのであるため、HBsAg レベルの定量は、転写活性な cccDNA のプールを

50

正確に反映する可能性は低い。HBV感染を検出するための高感度検査としてDNA力価がモニタリングされ、HBVの減少は治療応答の指標である。しかしながら、HBVのための現在のヌクレオシド類似体療法（逆転写を抑制する）は、pgRNAまたは他のmRNAの転写に影響せず、新しいrcDNAコピーの生成のみに影響を及ぼす。患者の血液（血漿または血清サンプルタイプ）におけるDNA力価の減少は、HBV RNAの減少に必ずしも対応しておらず、これは、カプシド化されたpgRNA（およびスプライシングされたRNA）が転写活性なcccDNAを保持する感染細胞によって分泌され得るために、遅れるかまたは一時的に増加する可能性がある。このため、HBV RNAは、HBVの疾患状態および治療有効性をモニターするための別個のマーカーとして研究されている。研究により、HBV RNAレベルが、処置の中止後のe抗原喪失、ウイルス再発、または「再発」事象等の転帰を予測することができるものであり、バイオマーカーが、HBV患者の処置終了のタイミングにおいて潜在的に重要であることが示されている。

10

【0011】

HBV RNA構造とバリエーションとの間の識別、およびRNAを相同DNA対応物から識別することは、疾患状態を理解するために重要である。最先端の当技術のアッセイは、ポリAテールを二段階（RTおよびPCR）RACE法で標的化する（van Bommel, et al., *Hepatology* 61:66-76 (2015); Zhang, et al., *Methods Mol Med* 95:29-44 (2004); Kairat, et al., *Intervirology* 42:228-237 (1999)、Schutz et al., *Journal of Virological Methods*, 86(2):167-171 (2000)。さらなるアッセイは、プレコアmRNAとpgRNAの転写開始部位間のゲノムの領域を標的とし、これらの形態を区別する（Wanget al., *Journal of Hepatology* 65:700-710 (2016)。mRNAの5'末端の長さの差の同様の標的化を使用して、pgRNAと、s抗原およびX抗原を産生するより小さなウイルスmRNAとを区別することもできる（Butler E.K. et al., *Hepatology*. 2018 68(6):2106-2117)。他のアッセイは、スプライシングされたRNA（またはDNA）バリエーションを標的とすることができる（Bayliss, et al., *J. Hepatol.* 59:1022-1028 (2013); Preiss, et al., *Hepatology* 48:741-749 (2008)。ポリA標的化RACEアッセイのいくつかを除くすべてのアッセイは、DNAからHBV RNAを識別するためのDNA除去法（例えば、DNase処理、またはRNAを優先するか、もしくはDNAを枯渇させるサンプル調製方法）の使用を必要とし、これは、残留DNAを残すか、または関与するさらなる工程によってRNA量もしくは完全性に影響を及ぼし得る、DNase不活性化工程または他の洗浄工程を伴わないqPCRにおけるアッセイの感度および潜在的な使用を制限する。ポリA標的化RACEアッセイおよびほとんどの他のアッセイは、手動のサンプル調製を必要とし、これは、1日で実行することができる試験の処理量を制限する。したがって、当技術分野における既存のアッセイは、単に十分に高感度ではない。したがって、手動のサンプル調製を必要とせず、DNase処理を省略する能力を有する、相同DNAのバックグラウンドでHBV RNAを検出する方法が当技術分野で必要とされている。

20

30

40

【0012】

分子診断の分野では、核酸の増幅および検出はかなり重要である。そのような方法は、任意の数のウイルスおよび細菌等の微生物を検出するために使用することができる。最も顕著で広く使用されている増幅技術は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。他の増幅技術としては、リガーゼ連鎖反応、ポリメラーゼリガーゼ連鎖反応、Gap-LCR、修復連鎖反応、3SR、NASBA、鎖置換増幅（SDA）、転写媒介増幅（TMA）およびQ増幅が挙げられる。

【0013】

PCRに基づく分析のための自動化されたシステムは、しばしば、同じ反応容器におけ

50

るPCRプロセス中の産物増幅のリアルタイム検出を利用する。そのような方法の重要な点は、レポーター基または標識を有する改変オリゴヌクレオチドの使用である。

【0014】

HBV感染は広範であり、世界人口の約3分の1が生涯のある時点で感染しており、そのうち3億4300万人が慢性感染症に罹患している。毎年75万人を超える人々がB型肝炎で死亡しており、これらの死亡の約30万人が肝臓がん起因すると考えられている。HBVの広範な感染性にもかかわらず、感染はほとんどが無症候性であるため、感染者の多くは認識していない。さらに、現在の診断方法は、HBV抗原、HBV抗原に対する抗体、またはHBV DNAの検出に焦点を合わせている。研究によって、血液中のHBV抗原またはHBV DNA力価の減少が、HBV RNAの減少に必ずしも対応しないことが示されている。したがって、当技術分野では、HBVの疾患状態および治療有効性をモニターするための、HBV RNAを検出する迅速で信頼性が高い高感度の方法が必要とされている。本明細書に記載の本発明は、手動のサンプル調製またはDNase処理の必要がない、相同DNAのバックグラウンドにおけるHBV RNAの検出を可能にする。

【発明の概要】

【0015】

本開示の特定の実施形態は、HBVの疾患状態および治療有効性をモニターするための、生物学的または非生物学的サンプル中のHBV RNAの存在または非存在の迅速な検出、例えば、単一の試験管内のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によるHBVの検出のための方法に関する。実施形態は、増幅工程およびハイブリダイズ工程を含み得る、少なくとも1つのサイクリング工程を実施することを含むHBVの検出方法を含む。さらに、実施形態は、オリゴヌクレオチド(逆転写プライマー(PCRプライマーであってもよい)、ブロックオリゴヌクレオチド、従来のプライマーおよびプローブを含む)、および単一のチューブでHBVを検出するために設計されたキットを含む。

【0016】

競合的ブロックオリゴヌクレオチドの使用は、相同DNAの存在下におけるRNAの検出および定量を改善する。HBV患者では、DNA含有ウイルスおよびRNAは共に血流中を循環しており、未処置の患者では、DNAレベルは典型的にはRNAレベルよりも高い。両方の形態は、他のサンプルタイプにおいても共に見出されるであろう。従来のPCR技術は、HBV RNA(pgRNAおよび他のスプライシングされていないmRNA)をDNAと区別することができず、これは、共通の配列が存在するためである(HBV RNA形態のサブセットのみがスプライシングされる)。DNA除去技術(例えば、DNase、またはRNAを優先するか、もしくはDNAを枯渇させることができる他のサンプル処理方法)はまた、RNA力価に影響を与える可能性があり、完全に有効ではない可能性があり、または有効性が可変する可能性があり、かつ、安定性、汚染、または自動化されたもしくはハイスループットのワークフローでの使用を妨げる他の欠点を有する可能性がある。

【0017】

HBV DNAとRNAとの間の1つの配列の違いは、pgRNAおよび他のmRNAのポリAテールであるが、オリゴd(T)プライマーを使用する方法は、非標的RNAまたはポリA伸長部を有する他の配列を検出することができる。「固定された」ポリT含有オリゴヌクレオチドは、非標的結合および伸長に対する特異性のいくらかの尺度を提供し得るが、これは、HBV DNAへのいくらかの結合をもたらすトレードオフ戦略である。本開示における方法は、DNAの存在下でRNAを標的とするアッセイの性能(感度および特異性)を改善するための方法として、RNA配列がポリAテール結合を有する標的においてDNA配列とマッチする競合的ブロックオリゴヌクレオチドを含む。競合的ブロックオリゴヌクレオチドが相同ゲノムHBV DNAに結合することによって、プライマー(例えば、RTプライマー)の結合が妨げられ、それによって相同ゲノムHBV DNAの望ましくない増幅が減少する。本方法の識別能をさらに改善するために、改変安定化塩基をアッセイオリゴヌクレオチドまたはブロッカーオリゴヌクレオチドに組み込むこと

ができる。

【 0 0 1 8 】

HBV RNA (特に、pgRNA等の転写物のための標準的なポリAテール位置を有するが、他のmRNAおよびスプライシングされたRNAも含む、cccDNAから転写されたHBV RNA)のポリAテールを標的とするプライマーおよびプローブを提供することができる。HBV DNAの存在下でRNAに対する特異性を増加させる競合的ブロックオリゴヌクレオチドを提供することができる。他のポリA部位、例えば、組み込まれたHBVコピーに由来し得るHBV転写物の二次または切断ポリA部位を標的とする、さらなるプライマーおよびプローブを提供することができる。HBV DNAの存在下でこれらの特異的ポリA部位を有するRNAに対する特異性を増加させる競合的ブロックオリゴヌクレオチドを提供することができる。

10

【 0 0 1 9 】

本開示の一実施形態は、サンプル中のB型肝炎ウイルス(HBV)RNAの1つまたは複数の標的核酸を検出する方法であって、(a)サンプルを提供すること、(b)HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸がサンプル中に存在する場合、増幅産物を産生するために、サンプルを1つまたは複数の競合的結合オリゴヌクレオチド、1つまたは複数のプライマーセットおよび核酸ポリメラーゼと接触させることを含む増幅工程を実施することを含み、1つまたは複数のプライマーセットは、少なくとも1つのフォワードプライマーおよびリバースプライマーとしても機能する少なくとも1つの逆転写(RT)プライマーを含み、(c)HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸がサンプル中に存在する場合、増幅産物を1つまたは複数のプローブと接触させることを含む、ハイブリダイゼーション工程を実施すること、および(d)増幅産物の存在または非存在を検出することであって、増幅産物の存在は、サンプル中のHBV RNAの1つまたは複数の標的核酸の存在を示し、増幅産物の非存在は、サンプル中のHBV RNAの1つまたは複数の標的核酸の非存在を示す、検出することを含む、検出工程を実施することを含む方法に関する。他の実施形態において、1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、サンプル中に存在し得る任意の相同HBV DNAにハイブリダイズし、それにより、サンプル中に存在し得る任意の相同HBV DNAへの1つまたは複数のプライマーセットの結合を防止する。他の実施形態において、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸は、共有結合的に閉じた環状二本鎖DNA(cccDNA)に由来する。他の実施形態において、cccDNAはHBVプレゲノムRNA(pgRNA)である。他の実施形態において、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸は、ポリAテールを含む。リバースプライマーとしても機能する少なくとも1つの逆転写(RT)プライマーは、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸のポリAテールに結合するためのポリT部分を含む。他の実施形態において、サンプルは、生物学的サンプルである。他の実施形態において、生物学的サンプルは、血漿である。他の実施形態において、生物学的サンプルは、血液である。他の実施形態において、(i)少なくとも一つのフォワードプライマーは、配列番号387の核酸配列またはその相補体を含み、(ii)リバースプライマーとしても機能する少なくとも一つの逆転写(RT)プライマーは、配列番号96、116、117、151および152から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、(iii)1つまたは複数のプローブは、配列番号388の核酸配列またはその相補体を含み、かつ(iv)1つまたは複数の競合ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む。

20

30

40

【 0 0 2 0 】

本開示の他の実施形態は、サンプル中のB型肝炎ウイルス(HBV)RNAの1つまたは複数の標的核酸を検出する方法であって、(a)サンプルを提供すること、(b)HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸がサンプル中に存在する場合、増幅産物を産生するために、サンプルを1つまたは複数の競合的結合オリゴヌクレオチド、1つまたは複数のプライマーセットおよび核酸ポリメラーゼと接触させることを含む増幅工程を実施することを含み、1つまたは複数のプライマーセットは、少なくとも1つのフォワードプライ

50

マーと、リバースプライマーとしても機能する少なくとも1つの逆転写(RT)プライマーとを含み、(c)HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸がサンプル中に存在する場合、増幅産物を1つまたは複数のプローブと接触させることを含む、ハイブリダイゼーション工程を実施すること、および(d)増幅産物の存在または非存在を検出することを含む検出工程を実施することを含み、増幅産物の存在は、サンプル中の1つまたは複数のHBV RNAの標的核酸の存在を示し、増幅産物の非存在は、サンプル中の1つまたは複数のHBV RNAの標的核酸の非存在を示し、1つまたは複数のプライマーセットは、少なくとも1つのフォワードプライマーと、リバースプライマーとしても機能する少なくとも1つの逆転写(RT)プライマーとを含み、かつ、(i)少なくとも一つのフォワードプライマーは、配列番号387の核酸配列またはその相補体を含み、(ii)リバースプライマーとしても機能する少なくとも1つの逆転写(RT)プライマーは、配列番号96、116、117、151および152から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、(iii)1つまたは複数のプローブは、配列番号388の核酸配列またはその相補体を含み、かつ(iv)1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む、方法に関する。他の実施形態において、1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、サンプル中に存在し得る任意の相同HBV DNAにハイブリダイズし、それにより、サンプル中に存在し得る任意の相同HBV DNAへの1つまたは複数のプライマーセットの結合を防止する。他の実施形態において、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸は、共有結合的に閉じた環状二本鎖DNA(cccDNA)に由来する。他の実施形態において、cccDNAはHBVプレゲノムRNA(pgRNA)である。他の実施形態において、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸は、ポリAテールを含む。リバースプライマーとしても機能する少なくとも1つの逆転写(RT)プライマーは、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸のポリAテールに結合するためのポリT部分を含む。他の実施形態において、サンプルは、生物学的サンプルである。他の実施形態において、生物学的サンプルは、血漿である。他の実施形態において、生物学的サンプルは、血液である。

【0021】

本開示の他の実施形態は、サンプル中に存在し得るB型肝炎ウイルス(HBV)RNAの1つまたは複数の標的核酸を検出するためのキットであって、(a)核酸ポリメラーゼ、(b)ヌクレオシド三リン酸、(c)少なくとも1つのフォワードプライマーと、リバースプライマーとしても機能する少なくとも1つの逆転写(RT)プライマーとを含む1つまたは複数のプライマーセット、(d)1つまたは複数のプローブ、および(e)1つまたは複数の競合的結合オリゴヌクレオチドを含むキットに関する。他の実施形態において、1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、サンプル中に存在し得る任意の相同HBV DNAにハイブリダイズし、それにより、サンプル中に存在し得る任意の相同HBV DNAへの1つまたは複数のプライマーセットの結合を防止する。他の実施形態において、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸は、共有結合的に閉じた環状二本鎖DNA(cccDNA)に由来する。他の実施形態において、cccDNAはHBVプレゲノムRNA(pgRNA)である。他の実施形態において、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸は、ポリAテールを含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する少なくとも1つの逆転写(RT)プライマーは、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸のポリAテールに結合するためのポリT部分を含む。他の実施形態において、サンプルは、生物学的サンプルである。他の実施形態において、(i)少なくとも1つのフォワードプライマーは、配列番号387の核酸配列またはその相補体を含み、(ii)リバースプライマーとしても機能する少なくとも1つの逆転写(RT)プライマーは、配列番号96、116、117、151および152から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、(iii)1つまたは複数のプローブは、配列番号388の核酸配列またはその相補体を含み、かつ(iv)1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

本開示の他の実施形態は、サンプル中の B 型肝炎ウイルス (H B V) R N A を検出するためのキットであって、 (a) 核酸ポリメラーゼ、 (b) ヌクレオシド三リン酸、 (c) 少なくとも 1 つのフォワードプライマーと、リバースプライマーとしても機能する少なくとも 1 つの逆転写 (R T) プライマーとを含む 1 つまたは複数のプライマーセット、 (d) 1 つまたは複数のプローブ、および (e) 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドを含む、 (i) 少なくとも一つのフォワードプライマーは、配列番号 3 8 7 の核酸配列またはその相補体を含み、 (i i) リバースプライマーとしても機能する少なくとも 1 つの逆転写 (R T) プライマーは、配列番号 9 6、1 1 6、1 1 7、1 5 1 および 1 5 2 から選択される群の 1 つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、 (i i i) 1 つまたは複数のプローブは、配列番号 3 8 8 の核酸配列またはその相補体を含み、かつ (i v) 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 1 1 の核酸配列またはその相補体を含む、方法に関する。他の実施形態において、1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、サンプル中に存在し得る任意の相同 H B V D N A にハイブリダイズし、それにより、サンプル中に存在し得る任意の相同 H B V D N A への 1 つまたは複数のプライマーセットの結合を防止する。他の実施形態において、H B V R N A の 1 つまたは複数の標的核酸は、共有結合的に閉じた環状二本鎖 D N A (c c c D N A) に由来する。他の実施形態において、c c c D N A は H B V プレゲノム R N A (p g R N A) である。他の実施形態において、H B V R N A の 1 つまたは複数の標的核酸は、ポリ A テールを含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する少なくとも 1 つの逆転写 (R T) プライマーは、H B V R N A の 1 つまたは複数の標的核酸のポリ A テールに結合するためのポリ T 部分を含む。他の実施形態において、サンプルは、生物学的サンプルである。他の実施形態において、生物学的サンプルは、血漿である。他の実施形態において、生物学的サンプルは、血液である。

10

20

【 0 0 2 3 】

本開示の 1 つの実施形態は、サンプル中の B 型肝炎ウイルス (H B V) R N A の 1 つまたは複数の標的核酸を検出する方法であって、 (a) サンプルを提供すること、 (b) H B V R N A の 1 つまたは複数の標的核酸がサンプル中に存在する場合、増幅産物を産生するために、サンプルを 1 つまたは複数の競合的結合オリゴヌクレオチド、1 つまたは複数のプライマーセットおよび核酸ポリメラーゼと接触させることを含む増幅工程を実施することを含み、1 つまたは複数のプライマーセットは、少なくとも 1 つのフォワードプライマーとリバースプライマーとしても機能する少なくとも 1 つの逆転写 (R T) プライマーとを含み、 (c) H B V R N A の 1 つまたは複数の標的核酸がサンプル中に存在する場合、増幅産物を 1 つまたは複数のプローブと接触させることを含む、ハイブリダイゼーション工程を実施すること、および (d) 増幅産物の存在または非存在を検出することであって、増幅産物の存在が、サンプル中の H B V R N A の 1 つまたは複数の標的核酸の存在を示し、増幅産物の非存在が、サンプル中の H B V R N A の 1 つまたは複数の標的核酸の非存在を示す、検出することを含む、検出工程を実施することを含む方法に関する。他の実施形態において、1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、サンプル中に存在し得る任意の相同 H B V D N A にハイブリダイズし、それにより、サンプル中に存在し得る任意の相同 H B V D N A への 1 つまたは複数のプライマーセットの結合を防止する。他の実施形態において、H B V R N A の 1 つまたは複数の標的核酸は、共有結合的に閉じた環状二本鎖 D N A (c c c D N A) に由来する。他の実施形態において、c c c D N A は H B V プレゲノム R N A (p g R N A) である。他の実施形態において、H B V R N A の 1 つまたは複数の標的核酸は、ポリ A テールを含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する 1 つまたは複数の逆転写 (R T) プライマーは、H B V R N A の 1 つまたは複数の標的核酸のポリ A テールに結合するためのポリ T 部分を含む。他の実施形態において、サンプルは、生物学的サンプル、例えば血漿および/または血液である。他の実施形態において、 (i) 1 つまたは複数のフォワードプライマーは、配列番号 3 8 7 の核酸配列またはその相補体を含み、 (i i) リバースプラ

30

40

50

イマーとしても機能する少なくとも1つの逆転写 (RT) プライマーは、配列番号 34、35、43、94、96、112、116、117、119、121、123、124、141、142、151、152、153、154、155、157、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、(iii) 1つまたは複数のプローブは、配列番号 388の核酸配列またはその相補体を含み、かつ(iv) 1つまたは複数の競合ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 1、2、3、4、5、9、10、11、14、および15の核酸配列またはその相補体を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーは2つの核酸配列を含み、2つの核酸配列は配列番号 151および152の核酸配列またはそれらの相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーは、配列番号 96の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号 11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーは、配列番号 43の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号 2の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーは、配列番号 96、112、116および117から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 2の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーは、配列番号 94、96、116、117、119、121、123、124、151、153、155および157から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーは、配列番号 142、161、162、163、164、165、166、167、168、169、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーは、配列番号 141、153、157、161、163、169、171、173、175、177、179、181、183、185、188および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーは、配列番号 35の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 1、2、3、4および5から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーは、配列番号 34の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 2、9、10、11および14から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーは、配列番号 151

10

20

30

40

50

の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号2、10、11および15から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む。

【0024】

本開示の他の実施形態は、サンプル中のB型肝炎ウイルス(HBV)RNAの1つまたは複数の標的核酸を検出する方法であって、(a)サンプルを提供すること、(b)HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸がサンプル中に存在する場合、増幅産物を産生するために、サンプルを1つまたは複数の競合的結合オリゴヌクレオチド、および1つまたは複数のプライマーセットと接触させることを含む増幅工程を実施することを含み、1つまたは複数のプライマーセットは、少なくとも1つのフォワードプライマーと、リバースプライマーとしても機能する少なくとも1つの逆転写(RT)プライマーとを含み、(c)HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸がサンプル中に存在する場合、増幅産物を1つまたは複数のプローブと接触させることを含む、ハイブリダイゼーション工程を実施すること、および(d)増幅産物の存在または非存在を検出することを含む検出工程を実施することを含み、増幅産物の存在は、サンプル中の1つまたは複数のHBV RNAの標的核酸の存在を示し、増幅産物の非存在は、サンプル中の1つまたは複数のHBV RNAの標的核酸の非存在を示し、1つまたは複数のプライマーセットは、1つまたは複数のフォワードプライマーと、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーとを含み、かつ、(i)1つまたは複数のフォワードプライマーは、配列番号387の核酸配列またはその相補体を含み、(ii)リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号34、35、43、94、96、112、116、117、119、121、123、124、141、142、151、152、153、154、155、157、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、(iii)1つまたは複数のプローブは、配列番号388の核酸配列またはその相補体を含み、かつ(iv)1つまたは複数の競合ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号1、2、3、4、5、9、10、11、14、および15から選択される群の核酸配列またはその相補体を含む、方法に関する。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは2つの核酸配列を含み、2つの核酸配列は配列番号151および152の核酸配列またはそれらの相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号96の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号43の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号2の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号96、112、116および117から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号2の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号94、96、116、117、119、121、123、124、151、153、155および157から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機

10

20

30

40

50

能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号142、161、162、163、164、165、166、167、168、169、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号141、153、157、161、163、169、171、173、175、177、179、181、183、185、188および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号35の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号1、2、3、4および5から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号34の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号2、9、10、11および14から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号151の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号2、10、11および15から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む。他の実施形態において、1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、サンプル中に存在し得る任意の相同HBV DNAにハイブリダイズし、それにより、サンプル中に存在し得る任意の相同HBV DNAへの1つまたは複数のプライマーセットの結合を防止する。他の実施形態において、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸は、共有結合的に閉じた環状二本鎖DNA(cccDNA)に由来する。他の実施形態において、cccDNAはHBVプレゲノムRNA(pgRNA)である。他の実施形態において、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸は、ポリAテールを含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸のポリAテールに結合するためのポリT部分を含む。一実施形態において、サンプルは、生物学的サンプルである。他の実施形態において、生物学的サンプルは、血漿である。他の実施形態において、生物学的サンプルは、血液である。

10

20

30

【0025】

本開示の他の実施形態は、サンプル中に存在し得るB型肝炎ウイルス(HBV)RNAの1つまたは複数の標的核酸を検出するためのキットであって、(a)核酸ポリメラーゼ、(b)ヌクレオチドモノマー、(c)1つまたは複数のフォワードプライマーと、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーとを含む1つまたは複数のプライマーセット、(d)1つまたは複数のプローブ、および(e)1つまたは複数の競合的結合オリゴヌクレオチドを含むキットに関する。他の実施形態において、1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、サンプル中に存在し得る任意の相同HBV DNAにハイブリダイズし、それにより、サンプル中に存在し得る任意の相同HBV DNAへの1つまたは複数のプライマーセットの結合を防止する。他の実施形態において、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸は、共有結合的に閉じた環状二本鎖DNA(cccDNA)に由来する。他の実施形態において、cccDNAはHBVプレゲノムRNA(pgRNA)である。他の実施形態において、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸は、ポリAテールを含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸のポリAテールに結合するためのポリT部分を含む。一実

40

50

施形態において、サンプルは、生物学的サンプルである。他の実施形態において、生物学的サンプルは、血漿である。他の実施形態において、生物学的サンプルは、血液である。他の実施形態において、(i) 1つまたは複数のフォワードプライマーは、配列番号 3 8 7 の核酸配列またはその相補体を含み、(i i) リバースプライマーとしても機能する少なくとも 1 つの逆転写 (R T) プライマーは、配列番号 3 4、3 5、4 3、9 4、9 6、1 1 2、1 1 6、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3、1 2 4、1 4 1、1 4 2、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 4、1 5 5、1 5 7、1 6 1、1 6 2、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6、1 6 7、1 6 8、1 6 9、1 7 0、1 7 1、1 7 2、1 7 3、1 7 4、1 7 5、1 7 6、1 7 7、1 7 8、1 7 9、1 8 0、1 8 1、1 8 2、1 8 3、1 8 4、1 8 5、1 8 6、1 8 7、1 8 8、1 8 9、および 1 9 0 から選択される群の 1 つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、(i i i) 1 つまたは複数のプローブは、配列番号 3 8 8 の核酸配列またはその相補体を含み、かつ (i v) 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 1、2、3、4、5、9、1 0、1 1、1 4、および 1 5 から選択される群の核酸またはその相補体を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する 1 つまたは複数の逆転写 (R T) プライマーは 2 つの核酸配列を含み、2 つの核酸配列は配列番号 1 5 1 および 1 5 2 の核酸配列またはそれらの相補体を含み、かつ 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 1 1 の核酸配列またはその相補体を含む 1 つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する 1 つまたは複数の逆転写 (R T) プライマーは、配列番号 9 6 の核酸配列またはその相補体を含み、かつ 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号 1 1 の核酸配列またはその相補体を含む 1 つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する 1 つまたは複数の逆転写 (R T) プライマーは、配列番号 4 3 の核酸配列またはその相補体を含み、かつ 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号 2 の核酸配列またはその相補体を含む 1 つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する 1 つまたは複数の逆転写 (R T) プライマーは、配列番号 9 6、1 1 2、1 1 6 および 1 1 7 から選択される群の 1 つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 2 の核酸配列またはその相補体を含む 1 つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する 1 つまたは複数の逆転写 (R T) プライマーは、配列番号 9 4、9 6、1 1 6、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3、1 2 4、1 5 1、1 5 3、1 5 5 および 1 5 7 から選択される群の 1 つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 1 1 の核酸配列またはその相補体を含む 1 つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する 1 つまたは複数の逆転写 (R T) プライマーは、配列番号 1 4 2、1 6 1、1 6 2、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1 6 6、1 6 7、1 6 8、1 6 9、1 7 1、1 7 2、1 7 3、1 7 4、1 7 5、1 7 6、1 7 7、1 7 8、1 7 9、1 8 0、1 8 1、1 8 2、1 8 3、1 8 4、1 8 5、1 8 6、1 8 7、1 8 8、1 8 9 および 1 9 0 から選択される群の 1 つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 1 1 の核酸配列またはその相補体を含む 1 つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する 1 つまたは複数の逆転写 (R T) プライマーは、配列番号 1 4 1、1 5 3、1 5 7、1 6 1、1 6 3、1 6 9、1 7 1、1 7 3、1 7 5、1 7 7、1 7 9、1 8 1、1 8 3、1 8 5、1 8 8 および 1 9 0 から選択される群の 1 つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 1 1 の核酸配列またはその相補体を含む 1 つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する 1 つまたは複数の逆転写 (R T) プライマーは、配列番号 3 5 の核酸配列またはその相補体を含み、かつ 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 1、2、3、4 および 5 から選択される群の 1 つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する 1 つまたは複数の逆転写 (R T) プライマーは、配列番号

10

20

30

40

50

34の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号2、9、10、11および14から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号151の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号2、10、11および15から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む。

【0026】

本開示の他の実施形態は、サンプル中のB型肝炎ウイルス(HBV)RNAを検出するためのキットであって、(a)核酸ポリメラーゼ、(b)ヌクレオチドモノマー、(c)1つまたは複数のフォワードプライマーと、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーとを含む1つまたは複数のプライマーセット、(d)1つまたは複数のプローブ、および(e)1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドを含み、(i)1つまたは複数のフォワードプライマーは、配列番号387の核酸配列またはその相補体を含み、(ii)リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号34、35、43、94、96、112、116、117、119、121、123、124、141、142、151、152、153、154、155、157、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、(iii)1つまたは複数のプローブは、配列番号388の核酸配列またはその相補体を含み、かつ(iv)1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号1、2、3、4、5、9、10、11、14および15の核酸配列またはその相補体を含む。方法に関する。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは2つの核酸配列を含み、2つの核酸配列は配列番号151および152の核酸配列またはそれらの相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号96の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号43の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号2の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号96、112、116および117から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号2の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号94、96、116、117、119、121、123、124、151、153、155および157から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号142、161、162、163、164、165、166、167、168、169、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号11の核酸

10

20

30

40

50

配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号141、153、157、161、163、169、171、173、175、177、179、181、183、185、188および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号35の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号1、2、3、4および5から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号34の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号2、9、10、11および14から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、配列番号151の核酸配列またはその相補体を含み、かつ1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号2、10、11および15から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む。他の実施形態において、1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、サンプル中に存在し得る任意の相同HBV DNAにハイブリダイズし、それにより、サンプル中に存在し得る任意の相同HBV DNAへの1つまたは複数のプライマーセットの結合を防止する。他の実施形態において、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸は、共有結合的に閉じた環状二本鎖DNA(cccDNA)に由来する。他の実施形態において、cccDNAはHBVプレゲノムRNA(pgRNA)である。他の実施形態において、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸は、ポリAテールを含む。他の実施形態において、リバースプライマーとしても機能する1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーは、HBV RNAの1つまたは複数の標的核酸のポリAテールに結合するためのポリT部分を含む。他の実施形態において、サンプルは、生物学的サンプル、例えば血漿および/または血液である。

【0027】

他の実施形態は、配列番号1~400またはその相補体から選択されるヌクレオチドの配列を含むかまたはそれからなるオリゴヌクレオチドであって、100以下のヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを提供する。他の実施形態において、本開示は、配列番号1~400またはその相補体の1つと少なくとも70%の配列同一性(例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%または95%等)を有する核酸を含むオリゴヌクレオチドであって、100以下のヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを提供する。一般的に、これらのオリゴヌクレオチドは、これらの実施形態では、プライマー核酸、RTプライマー核酸、競合的ブロック核酸、プローブ核酸等であり得る。これらの特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは40以下のヌクレオチド(例えば、35以下のヌクレオチド、30以下のヌクレオチド、25以下のヌクレオチド、20以下のヌクレオチド、15以下のヌクレオチド等)を有する。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つの改変ヌクレオチドを有し、例えば、非改変ヌクレオチドと比較して核酸ハイブリダイゼーション安定性を変化させる。オリゴヌクレオチドは、任意に少なくとも1つの標識および/または任意に少なくとも1つのクエンチャー部分を含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの保存的に改変された変異を含む。特定の核酸配列の「保存的に改変された変異」または単に「保存的変異」とは、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードするか、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一の配列をコードする、または同一の機能を果たし得るおよび/またはわずかに改変された標的にハイブリダイズする(すなわち、標的遺伝的多様性)等のさらなる機能を有し得る、同一または本質的に同一の核酸配列を含む核酸を指す。当技術分野の当業者であれば、コードされた配列中の単一のヌクレオチドまたは低いパ

10

20

30

40

50

ーセント比率のヌクレオチド（典型的には5%未満、より典型的には4%、2%または1%未満）を変更、付加または欠失させる個々の置換、欠失または付加は、改変がアミノ酸の欠失、アミノ酸の付加、または化学的に類似したアミノ酸によるアミノ酸の置換をもたらす「保存的改変変異」であることを認識するであろう。

【0028】

一態様において、増幅は、5'から3'へのヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ酵素を使用することができる。したがって、ドナー蛍光部分およびアクセプター部分、例えばクエンチャーは、プローブの長さに沿って互いに5~20ヌクレオチド（例えば、8または10ヌクレオチド）以内であり得る。他の態様において、プローブは、二次構造の形成を可能にする核酸配列を含む。そのような二次構造の形成は、第1と第2の蛍光部分との間の空間的近接をもたらす得る。この方法によれば、プローブ上の第2の蛍光部分はクエンチャーであり得る。

10

【0029】

本開示は、個体由来の生物学的サンプル中のHBV核酸、特にHBV RNAの存在または非存在を検出する方法を提供する。これらの方法は、血液スクリーニングおよび診断試験に使用するために、血漿中のHBV RNA（特に、pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA）の存在または非存在を検出するために使用することができる。さらに、同じ試験を当技術分野の当業者が使用して、尿および他の種類のサンプルを評価し、HBVまたはHBV RNA（特に、pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA）を検出および/または定量することができる。そのような種類のサンプルは、全血、血清、生検サンプル、細胞培養物、肝細胞等を含む、任意のそのようなサンプルを含むことができ、HBV RNA等のHBV核酸を見出し得る。また、そのような方法は、一般的に、増幅工程および色素結合工程を含む少なくとも1つのサイクリング工程を行うことを含む。典型的には、増幅工程は、核酸分子がサンプル中に存在する場合に1つまたは複数の増幅産物を生成する1つまたは複数対のオリゴヌクレオチドプライマーとサンプルを接触させることを含み、色素結合工程は、増幅産物を二本鎖DNA結合色素と接触させることを含む。そのような方法はまた、増幅産物への二本鎖DNA結合色素の結合の存在または非存在を検出することを含み、結合の存在はサンプル中のHBVまたはHBV RNA（特に、pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA）の存在を示し、結合の非存在はサンプル中のHBVまたはHBV RNA（特に、pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA）の非存在を示す。代表的な二本鎖DNA結合色素は、臭化エチジウムである。他の核酸結合色素としては、DAPI、Hoechst色素、PicoGreen（登録商標）、RiboGreen（登録商標）、OliGreen（登録商標）、およびシアニン色素、例えばYO-YO（登録商標）およびSYBR Greenが挙げられる。さらに、そのような方法はまた、増幅産物と二本鎖DNA結合色素との間の融解温度を決定することを含むことができ、融解温度はHBVまたはHBV RNA（特に、pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA）の存在または非存在を確認するものである。

20

30

【0030】

さらなる実施形態において、HBV RNA（特に、pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA）を含むHBVの1つまたは複数の核酸を検出および/または定量するためのキット。キットは、遺伝子標的の増幅に特異的な1つまたは複数のプライマーまたはプライマーのセット、1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチド、および増幅産物の検出に特異的な1つまたは複数の検出可能なオリゴヌクレオチドプローブを含み得る。プライマー、プローブまたはブロックオリゴヌクレオチドは、性能を改善するための改変塩基、例えばクランプもしくは安定化改変（例えば、pdUおよびロック核酸（LNA））またはプローブおよびブロックオリゴヌクレオチドの3'末端の伸長を防止する改変を含み得る。

40

【0031】

一態様において、キットは、ドナーおよび対応するアクセプター部分、例えば他の蛍光

50

部分または暗色クエンチャーで既に標識されているプローブを含むことができ、またはプローブを標識するためのフルオロフォア部分を含み得る。キットはまた、ヌクレオシド三リン酸、核酸ポリメラーゼおよび核酸ポリメラーゼの機能に必要な緩衝液をさらに含むことができる。キットはまた、プライマー、プローブおよびフルオロフォア部分を使用してサンプル中のHBVまたはHBV RNA（特に、HBV pgRNA）の存在または非存在を検出するための添付文書および説明書を含んでいてもよい。

【0032】

特段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様または同等の方法および材料を本主題の実施または試験で使用し得るが、好適な方法および材料が以下に記載される。さらに、材料、方法、および実施例は例示にすぎず、限定的であることは意図されない。矛盾する場合は、定義を含む本明細書が優先する。

10

【0033】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細は、添付の図面および以下の説明に示されている。本発明の他の特徴、目的および利点は、図面および発明を実施するための形態、ならびに特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1は、リバースプライマーとしても作用することができ、競合的ブロックオリゴヌクレオチドなしで標的mRNAのポリAテールに結合するポリT部分を有するRTオリゴヌクレオチドを示すHBVポリA標的アッセイ設計を示す。

20

【図2】図2は、リバースプライマーとしても作用することができ、競合的ブロックオリゴヌクレオチドと共に標的mRNAのポリAテールに結合するポリT部分を有するRTオリゴヌクレオチドを示すHBVポリA標的アッセイ設計を示す。

【図3】図3は、HBV RNAポリA標的アッセイのリアルタイムPCR成長曲線を示しており、RTプライマーおよび競合的ブロックオリゴヌクレオチドの存在下において、ポリAテールを有するHBVポリA部位配列を含有するRNA鋳型のより大量のコピーで出発すると、より多量のアンプリコンが産生されることを示す。

【図4】図4は、RNA標的なしであるが25万IUのHBV DNA（抽出および処理前のサンプルでは100万IU/mLに相当すると推定される）の存在下におけるHBV RNAポリA標的アッセイのリアルタイムPCR成長曲線を示し、ブロッカーなしの、RTプライマーの存在下においてアンプリコンが産生されること（オフターゲットDNA増幅）、およびRTプライマーおよび競合ブロックオリゴヌクレオチドの存在下におけるアンプリコンが産生されないことを示す。

30

【図5】図5は、DNAのみのサンプル、混合DNA+RNAサンプル、または競合的ブロッカーを含む混合サンプルの条件下における、HBV DNAに対する特異性を示すHBV RNAポリA標的アッセイのCT値を示す。

【図6】図6は、HBV RNAポリA標的アッセイの相対蛍光強度（RFI）の比較を示し、DNAのみ（競合的ブロッカーありまたはなし）および混合DNA+RNAサンプル（競合的ブロッカーありまたはなし）の条件下におけるHBV DNAに対する特異性を示す。

40

【図7】図7は、HBV RNAポリA標的アッセイのリアルタイムPCR成長曲線を示し、（上段）血清中100/コピー/mLのRNA標的であり、ブロッカーなしのRTプライマーの存在下におけるアンプリコンが産生されること、およびRTプライマーおよび競合的ブロックオリゴヌクレオチドの存在下で変化を示さないことを示し、（下段）RNA標的は存在しないが、血清中の10万IU/mLのHBV DNAの存在下において、ブロッカーなしのRTプライマーの存在下で低シグナルアンプリコンが産生されること（オフターゲットDNA増幅）およびRTプライマーおよび競合的ブロックオリゴヌクレオチドの存在下ではアンプリコン産生がないことを示す。

50

【図8】図8は、抽出および処理前のサンプル中の100コピー/mL RNA鋳型と同等であると推定されるRNAインプットレベルを有するHBV RNAポリA標的アッセイのリアルタイムPCR成長曲線を示し、サンプルは125 ng/rxnのヒトDNAバックグラウンドを含む。異なる設計および改変塩基を用いて4つの異なるRT/リバースプライマーを試験し、オリゴ設計および化学改変の調整によって見られ得る性能改善が示されている。

【図9】図9は、競合的ブロックオリゴヌクレオチドを用いたHBV RNAポリA標的アッセイのCT値を示し、混合DNA+RNAサンプルの条件下での高いHBV DNAインプットの耐性を示す。DNAを添加しない場合、このアッセイは、 1×10^9 コピー/mL ~ 10コピー/mLのHBV RNAの線形性を示す。DNAを 1×10^9 IU/mLの高レベルで添加した場合、RNAアッセイは、100および10コピー/mLのRNAを除いて影響を受けない。

【発明を実施するための形態】

【0035】

核酸増幅によるHBV感染の診断は、ウイルス感染を迅速に、正確に、確実に、特異的に、および感度よく検出および/または定量する方法を提供する。非生物学的または生物学的サンプル中の相同HBV DNAの存在下においてHBV RNA（特に、pg RNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA）を検出するためのリアルタイムPCRアッセイを本明細書に記載する。プライマー（RTプライマーを含む）、競合的ブロックオリゴヌクレオチド、およびHBVを検出および/または定量するためのプローブが提供され、そのようなプライマー、競合的ブロックオリゴヌクレオチド、およびプローブを含む製品またはキットが同様に提供される。他の方法と比較してHBV RNA（特に、pg RNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA）の検出のためのリアルタイムPCRの特異性および感度の上昇、ならびにサンプル含有および増幅産物のリアルタイム検出および定量を含むリアルタイムPCRの改善された特徴によって、臨床検査室におけるHBV感染の日常的な診断のためのこの技術の実施が実現可能になる。さらに、HBV RNA（特に、pg RNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA）を検出するためのこのリアルタイムPCRアッセイは、患者の状態（例えば、機能的治癒、滅菌治癒、および/または部分的治癒）に関する重要な情報を提供することができる。一例として、患者は、ヌクレオシド類似体処置によって枯渇したDNAウイルス力価を有し得るが、感染肝細胞におけるcccDNAの継続的な存在および転写活性を示す高い循環HBV RNAレベルを保持しているために、治療の除去はHBVの揺り戻しを引き起こす場合がある。他の例では、処置中の患者は、DNAマーカーとRNAマーカーの両方が抑制されている可能性があり、これは、cccDNAが肝臓で枯渇しているが、HBVのコピーが組み込まれた細胞から産生されたHbsAgを依然として有しているが、pg RNAおよび複製ウイルスを産生することはできないことを示している。

【0036】

さらに、この技術は、血液スクリーニング並びに予後診断に使用することができる。このHBV RNA検出アッセイはまた、他の核酸、例えば、HIV、HCVおよび他の肝炎ウイルス、例えばHAV、HEVおよび/またはHDV等を含むがこれらに限定されない他のウイルスの検出のための他のアッセイと並行して多重化することができる。

【0037】

本開示は、例えばTaqMan（登録商標）増幅および検出技術を用いてHBV RNAを特異的に同定するために、オリゴヌクレオチドプライマー（RTプライマーを含む）、競合的ブロックオリゴヌクレオチド、およびHBV核酸、特にHBV RNA（特に、pg RNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA）にハイブリダイズする蛍光標識加水分解プローブを含む。

【0038】

開示される方法は、1つまたは複数のプライマー対を使用してサンプルからの核酸分子遺伝子標的の1つまたは複数の部分を増幅することを含む、少なくとも1つのサイクリン

グ工程を実施することを含み得る。本明細書で使用される「HBVプライマー」または「HBV RTプライマー」は、HBVまたはHBV RNA（例えばHBV pgRNA）に見られる核酸配列に特異的にアニーリングし、それぞれの増幅産物を産生する適切な条件下でそこから逆転写および/またはDNA合成を開始するオリゴヌクレオチドプライマーを指す。標的に適したHBVに見られる核酸配列の例には、HBV pgRNAが含まれる。議論されるHBVプライマー（RTプライマーを含む）の各々は、各増幅産物の少なくとも一部が標的に対応する核酸配列を含むように標的にアニーリングする。1つまたは複数の増幅産物は、1つまたは複数の核酸がサンプル中に存在し、したがって1つまたは複数の増幅産物の存在がサンプル中のHBVおよび/またはHBV RNA（特に、pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA）の存在を示す場合に産生される。増幅産物は、HBVおよび/またはHBV RNAの1つまたは複数の検出可能なプローブ（特に、pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA）に相補的な核酸配列を含むべきである。本明細書で使用される「HBVプローブ」は、HBV標的核酸（例えば、HBV RNAまたはHBV pgRNA）に見られる核酸配列に特異的にアニーリングするオリゴヌクレオチドプローブを指す。各サイクリング工程は、増幅工程、ハイブリダイゼーション工程、および検出工程を含み、ここで、サンプル中のHBVおよび/またはHBV RNA（特に、pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA）の存在または非存在を検出するために、サンプルを1つまたは複数の検出可能なHBVまたはHBV RNA（特に、pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA）プローブと接触させる。

【0039】

本明細書で使用される用語「ブロックオリゴヌクレオチド」（「競合的ブロックオリゴヌクレオチド」または「ブロッカー」）は、相補的DNAに特異的にアニーリングし、逆転写およびDNA重合を阻害する非伸長性オリゴヌクレオチドを指す。ブロックオリゴヌクレオチドの存在下では、サンプル中に存在し得る任意のHBV DNAがブロックオリゴヌクレオチドにハイブリダイズし、それによってHBV DNAを、HBV DNAとHBV RNAの両方に一致する短い配列を含み得るHBV RNAのポリA結合部を標的とするプライマーに結合することができないようにする。したがって、ブロックオリゴヌクレオチドは、サンプル中に存在し得る相同HBV DNAへのプライマー結合を防止する。本開示の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、相同HBV DNA、例えばHBV DNAゲノムにハイブリダイズする。本開示の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、増幅プライマーのHBV結合部分の一部または全部と重複するHBV DNAにハイブリダイズまたは結合する。相同HBV DNAに結合することによって、競合的ブロックオリゴヌクレオチドはHBV DNA上の結合部位をブロックし、それによって本開示のプライマー（HBV RNAにハイブリダイズする）が相同HBV DNAにハイブリダイズするのを防ぐ。この効果は、プライマーが、より強力に結合するブロックオリゴヌクレオチドとの結合部位における競合のために相同HBV DNAに効率的にハイブリダイズしないために、相同HBV DNAが増幅されないことである（サンプル中のHBV RNAが非常に過剰な濃度である場合を除く）。したがって、HBV RNAを選択的に検出および増幅する本開示の方法は、HBV RNAが非常に過剰な濃度である場合を除いて、混入している望ましくないHBV DNAを不注意に検出および増幅しない。本開示の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは一本鎖であり、15～100ヌクレオチド、いくつかの実施形態では20～80ヌクレオチド、特定の実施形態では20～70ヌクレオチド長の範囲の様々な長さであり得る。例えば、本開示の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、24～61ヌクレオチドの範囲であり得、配列番号1～15のいずれか1つを含むかまたはこれからなり得る。本開示の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、性能を改善するための改変ヌクレオチド、例えばクランプまたは安定化改変（例えば、pdUおよびロック核酸（LNA））を含み得る。例えば、そのような改変安定化ヌクレオチドは、融解温度（ T_m ）および/または結合強度を高めるために含み得る。特定の実施形態において、本開示の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、例えば、以下の表10～表12に例示される

10

20

30

40

50

ような改変を含む。さらに、本開示の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、3'末端の伸長を妨げる改変も含み得る。非伸長性末端は、C3スペーサー、リン酸、ジデオキシヌクレオチドによって、または第2のオリゴヌクレオチドの3'末端をオリゴヌクレオチドの3'末端に結合すること等によって促進され得る。いくつかの実施形態において、本開示の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、伸長を妨げるように3'末端に非伸長性C3スペーサーを付加することによって改変される。特定の実施形態において、本開示の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号1~15またはその相補体を含むか、またはそれらからなり、特に、配列番号1~5、9~11、14および15またはそれらの相補体を含むかまたはそれらからなり、非伸長性C3スペーサーを3'末端に付加することによって改変される(例えば、図2を参照されたい)。特定の実施形態において、本開示の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号1~15またはその相補体を含むか、またはそれらからなり、特に、配列番号1~5、9~11、14および15またはそれらの相補体を含むかまたはそれらからなり、少なくとも1つの改変ヌクレオチドを含み、かつ非伸長性C3スペーサーを3'末端に付加することによって改変される(例えば、図2を参照されたい)。この方法によって、本開示の競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、核酸ポリメラーゼの存在下では伸長されず、核酸ポリメラーゼは、それらの標的(例えば、HBV RNA特異的プライマー)にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーのみを伸長する。したがって、核酸ポリメラーゼの存在下において本開示のブロックオリゴヌクレオチドは、標的HBV RNAの増幅を可能にしながら、生物学的サンプル中のHBV DNAの増幅を効率的に遮断することができる。さらに、競合的ブロックオリゴヌクレオチドの使用によって、HBV RNAとDNAとを区別することができるHBV RNAアッセイが効果的に可能になる。したがって、開示される競合的ブロックオリゴヌクレオチドの使用は、分離工程(例えば、カラムまたはスピカラムを使用する)またはDNAの酵素消化のいずれかによってDNAを除去する工程を必要としないため、従来のDNA除去技術に対する実質的な改善である。

【0040】

本明細書で使用される用語「増幅する」は、鋳型核酸分子(例えば、HBVゲノムおよび/またはHBV RNAからの核酸分子(特に、pgRNA等の、cccDNAから転写されたHBV RNA))の一方または両方の鎖に相補的な核酸分子を合成するプロセスを指す。核酸分子を増幅することは、典型的には、鋳型核酸を変性すること、プライマーの融解温度未満の温度でプライマーを鋳型核酸にアニーリングすること、および増幅産物を生成するためにプライマーから酵素的に伸長することを含む。増幅には、典型的には、デオキシリボヌクレオシド三リン酸、DNAポリメラーゼ酵素(例えば、Platinum(登録商標)Taq)ならびにポリメラーゼ酵素の最適な活性のための適切な緩衝液および/または補因子(例えば、MgCl₂および/またはKCl)の存在が必要である。

【0041】

本明細書で使用される「プライマー」という用語は、当業者に知られており、オリゴマー化合物、主にオリゴヌクレオチドを指すが、鋳型依存性DNAポリメラーゼによるDNA合成を「プライミング」することができる改変オリゴヌクレオチドも指しており、すなわち、オリゴヌクレオチドの3'末端が遊離3'-OH基を提供し、そこに、3'から5'へのホスホジエステル結合を確立する鋳型依存性DNAポリメラーゼによって更に「ヌクレオチド」が結合され得て、それによってデオキシヌクレオシド三リン酸が使用され、それによってピロリン酸が放出される。いくつかの実施形態において、プライマーは逆転写(RT)プライマー(RTプライマー)でもある。オリゴ(dT)_nプライマー、固定オリゴ(dT)_nプライマー、ランダムヘキサマープライマー、および配列特異的プライマーを含む、当技術分野で公知のいくつかの種類RTプライマーが存在する。いくつかの実施形態において、RTプライマーは、RNA(例えば、HBV RNA、特にpgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA)にアニーリングし、伸長してDNA相補体を生成する(すなわち、標的の逆転写)。いくつかの実施形態において、RTプライマーはポリA含有HBV RNAを標的とし、したがってRTプライマーはポリT含有オリ

ゴヌクレオチドである。

【0042】

用語「ハイブリダイズする」は、増幅産物への1つまたは複数のプローブのアニーリングを指す。「ハイブリダイゼーション条件」は、典型的には、プローブの融解温度より低い、プローブの非特異的ハイブリダイゼーションを回避する温度を含む。

【0043】

「5'から3'ヌクレアーゼ活性」という用語は、典型的には核酸鎖合成に関連し、それによってヌクレオチドが核酸鎖の5'末端から除去される核酸ポリメラーゼの活性を指す。

【0044】

「熱安定性ポリメラーゼ」という用語は、熱安定性であるポリメラーゼ酵素を指し、すなわち、該酵素は、鋳型に相補的なプライマー伸長産物の形成を触媒し、二本鎖鋳型核酸の変性をもたらすのに必要な時間にわたり高温に曝された場合、不可逆的には変性しない。一般に、合成は各プライマーの3'末端で開始され、鋳型鎖に沿って5'から3'方向へ進行する。熱安定性ポリメラーゼは、例えば、サーマス・サーモフィルス (*Thermus flavus*)、*T. ルーバー* (*T. ruber*)、*T. サーモフィルス* (*T. thermophilus*)、*T. アクアティカス* (*T. aquaticus*)、*T. ラクテウス* (*T. lacteus*)、*T. ルベンス* (*T. rubens*)、バチルス・ステアロテルモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*)、およびメタノサーマス・フェルピダス (*Methanothermus fervidus*) から単離されている。それにもかかわらず、必要に応じて酵素が補充されるならば、熱安定性でないポリメラーゼをPCRアッセイに用いることもできる。

【0045】

用語「その相補体」は、所与の核酸と同じ長さであり、正確に相補的である核酸を指す。

【0046】

核酸に関して使用される場合の用語「伸長」または「延長」は、追加のヌクレオチド(または他の類似の分子)が核酸に組み込まれる場合を指す。例えば、核酸は、ヌクレオチドを取り込む生体触媒によって、例えば、典型的には核酸の3'末端にヌクレオチドを付加するポリメラーゼによって、任意に伸長される。

【0047】

2以上の核酸配列の文脈における用語「同一」または「同一性」パーセントは、例えば、当業者に利用可能な配列比較アルゴリズムの1つを使用してまたは目視検査によって測定して最大的一致に関して比較およびアラインメントした場合に、同一または特定パーセントの同一ヌクレオチドを有する2以上の配列または部分配列を指す。パーセント配列同一性および配列類似性の決定に適した例示的なアルゴリズムは、BLASTプログラムであり、例えば、Altschul et al. (1990)「Basic local alignment search tool」*J. Mol. Biol.* 215:403-410、Gish et al. (1993)「Identification of protein coding regions by database similarity search」*Nature Genet.* 3:266-272、Madden et al. (1996)「Applications of network BLAST server」*Meth. Enzymol.* 266:131-141、Altschul et al. (1997)「Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs」*Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402、およびZhang et al. (1997)「PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation」*Genome Res.* 7:649-656に記載されている。

【0048】

オリゴヌクレオチドの文脈における「改変ヌクレオチド」とは、オリゴヌクレオチド配

列の少なくとも1つのヌクレオチドが、オリゴヌクレオチドに所望の特性を提供する異なるヌクレオチドによって置換される変化を指す。本明細書に記載のオリゴヌクレオチド中で置換され得る例示的な改変ヌクレオチドとしては、例えば、t-ブチルベンジル、C5-メチル-dC、C5-エチル-dC、C5-メチル-dU、C5-エチル-dU、2,6-ジアミノプリン、C5-プロピニル-dC、C5-プロピニル-dU、C7-プロピニル-dA、C7-プロピニル-dG、C5-プロパルギルアミノ-dC、C5-プロパルギルアミノ-dU、C7-プロパルギルアミノ-dA、C7-プロパルギルアミノ-dG、7-デアザ-2-デオキシ-キサントシン、ピラゾロピリミジン類似体、擬似dU、ニトロピロール、ニトロインドール、2'-O-メチルリボ-U、2'-O-メチルリボ-C、N4-エチル-dC、N6-メチル-dA、5-プロピニル-dU、および5-プロピニル-dC等が挙げられる。改変されたヌクレオチドの他の例としては、ロック核酸(LNA)が挙げられる。LNA(アクセス不能RNAとしても知られる)は、リボース部分が2'炭素と4'炭素とを接続する過剰な架橋で改変された改変RNAヌクレオチドである。この架橋は、A型二重鎖にしばしば見られる3'-エンド(North)確認(confirmat ion)においてリボースをロックする。LNAの効果は、ロックされたりボース配座が、オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション特性(融解温度)を有意に増加させる塩基のスタッキングおよび骨格の事前編成を増強することである。オリゴヌクレオチド中で置換され得る多くの他の改変ヌクレオチドは、本明細書で言及されるか、または当技術分野で知られている。特定の実施形態において、改変ヌクレオチド置換は、対応する改変されていないオリゴヌクレオチドの融解温度と比較して、オリゴヌクレオチドの融解温度(T_m)を改変する。さらに説明すると、特定の改変ヌクレオチド置換は、いくつかの実施形態において、非特異的核酸増幅を減少させ(例えば、プライマーダイマー形成等を最小限に抑える)、意図する標的アンプリコンの収率を増加させること等ができる。これらの種類の核酸改変の例は、例えば、米国特許第6,001,611号に記載されている。他の改変ヌクレオチド置換は、オリゴヌクレオチドの安定性を変化させ得るか、または他の望ましい特徴を提供し得る。例えば、いくつかの改変は、オリゴヌクレオチドを非伸長性にすることができ、これはプローブおよび競合的ブロックオリゴヌクレオチドに有用である。非伸長性末端は、C3スペーサー、リン酸、ジデオキシヌクレオチドに加えて、第2のオリゴヌクレオチドの3'末端をオリゴヌクレオチドの3'末端に結合すること等によって促進し得る。

HBV標的核酸の検出

【0049】

本開示は、例えば、ポリAテール(例えば、pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA)に隣接するHBV核酸配列の一部を増幅することによってHBV RNA(特に、pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA)を検出する方法を提供する。具体的には、HBV核酸分子標的を増幅および検出するためのプライマー、競合的ブロックオリゴヌクレオチドおよびプローブが本開示の実施形態によって提供される。

【0050】

HBV RNA(特に、pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA)の検出のために、HBV標的核酸例えばHBV RNA(特に、pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA)を増幅するためのプライマー、競合的ブロックオリゴヌクレオチド、およびプローブが提供される。本明細書に例示されるもの以外のHBV核酸も、サンプル中のHBV RNA(特に、pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA)を検出するために使用することができる。例えば、機能的バリエーションは、日常的な方法を使用して当業者によって特異性および/または感度について評価され得る。代表的な機能的バリエーションは、例えば、本明細書に開示されるHBV核酸における1つまたは複数の欠失、挿入および/または置換を含み得る。

【0051】

より具体的には、オリゴヌクレオチドの実施形態はそれぞれ、配列番号1~392から

10

20

30

40

50

選択される配列を有する核酸、配列番号 1 ~ 392 の 1 つと少なくとも、例えば 80 %、90 %、もしくは 95 % の配列同一性を有するその実質的に同一のバリエーション、または配列番号 1 ~ 192 の相補体およびバリエーションを含む。例えば、ポリ A 結合プライマーのポリ T 伸長部中の T の数は変化してよく (8、10、12、15、17、および 18 等)、ポリ A テールの接合部における HBV 結合または他のアンカーの存在および長さは変化してよく (5、7、および 8 bp 長等)、プライマー中の改変塩基の存在、種類、数および位置は変化し得る。

【0052】

一実施形態において、HBV プライマー、競合的ブロックオリゴヌクレオチド、およびプローブの上記のセットは、HBV を含むと疑われる生物学的サンプル (N が任意のヌクレオチドを指すことを意味する、配列表) 中の HBV RNA (特に、pg RNA 等の cccDNA から転写された HBV RNA) の検出を提供するために使用される。プライマー、競合的ブロッキングオリゴヌクレオチド、およびプローブのセットは、配列番号 1 ~ 392 の核酸配列を含むかまたはそれからなる、プライマー、競合的ブロックオリゴヌクレオチド、および HBV 核酸配列 (例えば、pg RNA 等の cccDNA から転写された HBV RNA などの HBV RNA) に特異的なプローブを含むかまたはそれからなり得る。他の実施形態では、プライマー、競合的ブロッキングオリゴヌクレオチド、および HBV 標的に対するプローブ (HBV RNA、例えば cccDNA から転写された HBV RNA (例えば、HBV pg RNA)) は、配列番号 1 ~ 392 のプライマー、競合的ブロックオリゴヌクレオチド、およびプローブのいずれかの機能的に活性なバリエーションを含むか、またはそれらからなる。

【0053】

配列番号 1 ~ 392 のプライマー (RT プライマーを含む)、競合的ブロックオリゴヌクレオチド、および/またはプローブのいずれかの機能的に活性なバリエーションは、開示される方法においてプライマー (RT プライマーを含む)、競合的ブロックオリゴヌクレオチド、および/またはプローブを使用することによって同定され得る。配列番号 1 ~ 392 のいずれかのプライマー、競合的ブロックオリゴヌクレオチドおよび/またはプローブの機能的に活性なバリエーションは、配列番号 1 ~ 392 のそれぞれの配列と比較して、記載の方法またはキットにおいて、類似しているか、またはより高い特異性および感度を提供するプライマー、競合的ブロックオリゴヌクレオチドおよび/またはプローブに関する。

【0054】

バリエーションは、例えば、配列番号 1 ~ 392 のそれぞれの配列の 5' 末端および/または 3' 末端における 1 つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換等の 1 つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換によって、配列番号 1 ~ 392 の配列から変化し得る。上に詳述したように、プライマー (RT プライマーを含む)、競合的ブロックオリゴヌクレオチド、および/またはプローブは化学的に改変されていてもよく、すなわちプライマー、競合的ブロックオリゴヌクレオチド、および/またはプローブは改変ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド化合物を含んでいてもよい。プライマー、競合的ブロックオリゴヌクレオチド、および/またはプローブは、改変オリゴヌクレオチドである。「改変ヌクレオチド」(または「ヌクレオチド類似体」)は、いくつかの改変によって天然の「ヌクレオチド」とは異なるが、依然として、塩基もしくは塩基様化合物、ペントフラノシル糖もしくはペントフラノシル糖様化合物、リン酸部分もしくはリン酸様部分、またはそれらの組合せからなる。例えば、「ヌクレオチド」の塩基部分に「標識」を結合させて、「改変ヌクレオチド」を得ることができる。「ヌクレオチド」中の天然塩基は、例えば 7-デアザプリンで置き換えられてもよく、それによっても同様に「改変ヌクレオチド」が得られる。用語「改変ヌクレオチド」または「ヌクレオチド類似体」は、本出願において互換的に使用される。「改変ヌクレオチド」(または「ヌクレオチド類似体」)は、「改変ヌクレオチド」(または「ヌクレオチド類似体」)について上に概説したように、何らかの改変によって天然のヌクレオチドとは異なる。

【0055】

HBV標的をコードする核酸分子を増幅する改変オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド類似体を含むオリゴヌクレオチドは、例えば、OLIGO (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, Colo.)等のコンピュータプログラムを使用して設計し得る。増幅プライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドを設計する際の重要な特徴としては、検出(例えば、電気泳動によって)を容易にするための適切なサイズの増幅産物、一对のプライマーのメンバーに対する同様の融解温度、および各プライマーの長さ(すなわち、プライマーは、配列特異性でアニーリングし、合成を開始するのに十分な長さである必要があるが、オリゴヌクレオチド合成中に正確性が低下するほど長くはない)が挙げられるが、これらに限定されない。典型的には、オリゴヌクレオチドプライマーは8~50ヌクレオチド長(例えば、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48または50ヌクレオチド長)である。

10

【0056】

アッセイにおいて、「競合的ブロックオリゴヌクレオチド」、「競合的ブロックヌクレオチド」、「競合的ブロック核酸」、「ブロックオリゴヌクレオチド」、「ブロックヌクレオチド」、「ブロッカー」、および/または「ブロック核酸」が使用され、競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、プライマー(例えば、RTプライマー)によって標的化される領域と同一であるが、例えばRTプライマーにポリA配列を含まず、代わりに対応するゲノム配列に伸長することによって、RTプライマーよりも高いDNA親和性を有する相同ゲノムHBV DNA内の領域に結合することを指す用語である。すなわち、競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、標的領域への結合についてプライマーと競合するが、設計は、競合的ブロックオリゴヌクレオチドがDNAに対してより大きい親和性を有する一方で、RTプライマーがRNAに対してより大きい親和性を有することを可能にするように(例えば、結合した配列の長さ、 T_m または位置の違い等)行うことができる。競合的ブロックオリゴヌクレオチドが相同ゲノムHBV DNAに結合することによって、プライマー(例えば、RTプライマー)の結合が妨げられ、それによって相同ゲノムHBV DNAの望ましくない増幅が減少および/防止され。

20

【0057】

HBV RNA(例えば、pgRNA等のcccDNA由来のHBV)等のHBV核酸の存在または非存在を検出するためのフォワードプライマーのセットは、配列番号20、23、24、210、213、214、387、および389の配列を含む。HBV RNA(例えば、pgRNA等のcccDNA由来のHBV)等のHBV核酸の存在または非存在を検出するためのRT/リバープライマーのセットは、配列番号16、18、19、25~30、33~190、206、208、209、215~220および223~380の配列を含む。HBV RNA(例えば、pgRNA等のcccDNA由来のHBV)等のHBV核酸の存在または非存在を検出するための競合的ブロックオリゴヌクレオチドのセットは、配列番号1~15、21、22、191~205、211および212の配列を含む。HBV RNA(例えば、pgRNA等のcccDNA由来のHBV)等のHBV核酸の存在または非存在を検出するためのプローブのセットは、配列番号17、31、32、207、221、222、381~386、388および390~392の配列を含む。

30

40

【0058】

1セットのプライマーおよび競合的ブロックオリゴヌクレオチドに加えて、方法は、HBV RNA(例えば、pgRNA等のcccDNA由来のHBV)等のHBV核酸の存在または非存在を検出するために1つまたは複数のプローブを使用することができる。用語「プローブ」は、合成的または生物学的に産生された核酸(DNAまたはRNA)を指し、これは、設計または選択により、規定される所定のストリンジェンシーの下で特異的に(すなわち、優先的に)、「標的核酸」に、この場合はHBV核酸(HBV RNA、例えばpgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA)(標的)核酸にハイブリダイズすることを可能にする、特定のヌクレオチド配列を含む。「プローブ」は、標

50

的核酸を検出することを意味する「検出プローブ」と称され得る。

【0059】

いくつかの実施形態において、記載されるHBV核酸プローブ（pgRNA等の、cccDNAから転写されたHBV RNA等のHBV RNAのためのプローブを含む）は、少なくとも1つの蛍光標識で標識することができる。一実施形態において、HBV核酸プローブ（pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA等のHBV RNAのためのプローブを含む）は、ドナー蛍光部分、例えば蛍光色素、および対応するアクセプター部分、例えばクエンチャーを用いて標識することができる。一実施形態において、プローブは蛍光部分を含むか、またはそれからなり、核酸配列は配列番号17、31、32、207、221、222、381～386、388および390～392を含むか、またはそれからなる。

10

【0060】

プローブとして使用されるオリゴヌクレオチドの設計は、プライマーの設計と同様の方法で行うことができる。実施形態は、増幅産物の検出のために単一のプローブまたは一対のプローブを使用することができる。実施形態に応じて、使用するプローブは、少なくとも1つの標識および/または少なくとも1種のクエンチャー部分を含み得る。プライマーと同様に、プローブは通常増幅方法の熱サイクリングパラメーターに適切な融解温度を有し、各プローブの長さは配列特異的ハイブリダイゼーションが起こるのに十分でなければならないが、合成中に正確性が低下するほど長くはない。オリゴヌクレオチドプローブは、一般的に15～40（例えば、16、18、20、21、22、23、24、または25）ヌクレオチド長である。

20

【0061】

コンストラクトは、HBVに対するプライマー、競合的ブロックオリゴヌクレオチド、およびプローブ核酸分子（例えば、配列番号1～392）の配列の1つまたは複数をそれぞれ含むベクターを含み得る。コンストラクトは、例えば、対照鋳型核酸分子として使用することができる。使用に適したベクターは、市販されている、および/または当技術分野で日常的な組換え核酸技術法によって製造される。HBV核酸分子は、例えば、化学合成、HBVからの直接クローニング、または核酸増幅によって得ることができる。

【0062】

本方法での使用に適したコンストラクトは、典型的には、HBV核酸分子（例えば、配列番号1～392の1つまたは複数の配列を含む核酸分子）に加えて、所望のコンストラクトおよび/または形質転換体を選択するための選択マーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子）をコードする配列、ならびに複製起点を含む。ベクター系の選択は、通常、宿主細胞の選択、複製効率、選択性、誘導性および回収の容易さを含むがこれらに限定されない、いくつかの要因に依存する。

30

【0063】

HBV核酸分子を含有するコンストラクトを、宿主細胞内で増殖させ得る。本明細書で使用される宿主細胞という用語は、原核生物および真核生物、例えば酵母、植物および動物細胞を含むことを意味する。原核生物宿主としては、大腸菌（*E. coli*）、サルモネラ・チフィリウム（*Salmonella typhimurium*）、セラチア・マルセセンス（*Serratia marcescens*）およびバチルス・ズブチリス（*Bacillus subtilis*）が挙げられる。真核生物宿主としては、*S. cerevisiae*、*S. pombe*、*Pichia pastoris*などの酵母、COS細胞またはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などの哺乳動物細胞、昆虫細胞、ならびにアラビドプシスタリアナ（*Arabidopsis thaliana*）およびニコチアナ タバカム（*Nicotiana tabacum*）などの植物細胞が挙げられる。コンストラクトを、当業者に一般的に知られている技術のいずれかを使用して宿主細胞に導入することができる。例えば、リン酸カルシウム沈殿、エレクトロポレーション、熱ショック、リポフェクション、マイクロインジェクションおよびウイルス媒介核酸移入は、核酸を宿主細胞に導

40

50

入するための一般的な方法である。さらに、ネイキッドDNAを細胞に直接送達することができる（例えば、米国特許第5,580,859号および同第5,589,466号参照）。

【0064】

コンストラクト（プラスミドベクター）を使用して、インビトロ転写または他のプロセスを介してRNA分子を生成し、プライマーおよびプローブの結合部位も含み得るRNA鋳型を生成することができる。RNA鋳型分子も合成によって作製することができる。対照材料として作成することができるRNA鋳型の種類は、外装RNA（タンパク質コート内に封入されたRNA分子）であり、コンストラクト（例えば、細菌宿主中）によるRNAおよびコートタンパク質（例えば、ウイルスカプシドタンパク質）の産生、およびRNA分子を封入するコートタンパク質の構築を伴う。DNA分子は、対照材料として使用するためにタンパク質コートに封入することもできる。

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）

【0065】

米国特許第4,683,202号、同第4,683,195号、同第4,800,159号および同第4,965,188号は、従来のPCR技術を開示している。PCRは、典型的には、選択された核酸鋳型（例えば、DNAまたはRNA）に結合する2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いる。いくつかの実施形態において有用なプライマーには、記載されるHBV核酸配列内の核酸合成の開始点として作用することができるオリゴヌクレオチドが含まれる（例えば、配列番号15、18~20、23~30、33~190、206、208~210、213~220および223~380）。いくつかの実施形態において、プライマーは逆転写（RT）プライマー（RTプライマー）である。プライマーは、従来の方法によって制限消化物から精製することができるか、または合成的に産生することができる。プライマーは増幅における最大効率には一本鎖が好ましいが、プライマーは二本鎖であってもよい。二本鎖プライマーは、最初に変性される、すなわち、鎖を分離するために処理される。二本鎖核酸を変性させる1つの方法は、加熱によるものである。

【0066】

鋳型核酸が二本鎖である場合、PCRで鋳型として使用することができるようにする前に、二本鎖を分離することが必要である。鎖分離は、物理的、化学的、または酵素的手段を含む任意の好適な変性方法によって達成することができる。核酸鎖を分離する1つの方法は、核酸が優位に変性する（例えば、50%、60%、70%、80%、90%、または95%を超える変性）まで加熱することを含む。鋳型核酸を変性させるのに必要な加熱条件は、例えば、緩衝塩濃度、ならびに変性される核酸の長さおよびヌクレオチド組成に依存するが、典型的には、温度および核酸長などの反応の特徴に応じて、約90~約105の範囲である。変性は、典型的には、約30秒~4分間（例えば、1分~2分30秒、または1.5分）行われる。

【0067】

二本鎖の鋳型核酸が熱により変性された場合、反応混合物は、その標的配列に対する各プライマーのアニーリングを促進する温度まで冷却される。アニーリングの温度は、通常、約35~約65、（例えば、約40~約60、約45~約50）である。アニーリング時間は、約10秒~約1分（例えば、約20秒~約50秒、約30秒~約40秒）であり得る。必要に応じて、ポリメラーゼの活性が促進または最適化される温度、すなわち、アニーリングされたプライマーから伸長が起こって、鋳型核酸に相補的な生成物を生成するのに十分な温度に、反応混合物を調節する。温度は、核酸鋳型にアニーリングされた各プライマーから伸長産物を合成するのに充分でなくてはならないが、その相補的な鋳型から伸長産物を変性させるほど高くすべきではない（例えば、伸長のための温度は、一般的に、約40~約80（例えば、約50~約70、約60）の範囲である）。伸長時間は、約10秒~約5分（例えば、約30秒~約4分、約1分~約3分、約1分30秒~約2分）であり得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 8 】

レトロウイルスまたはRNAウイルスのゲノムは、リボ核酸、すなわちRNAから構成される。HBVは、ウイルス複製のために宿主酵素によって作られるRNAを必要とする、その複製過程において逆転写を依然として使用する非レトロウイルスであるパラレトロウイルスである。そのような場合、鋳型核酸であるRNAは、酵素逆転写酵素の作用を介して相補的DNA (cDNA) に最初に転写されなければならない。逆転写酵素は、RNA鋳型およびRNAの3'末端に相補的な短いプライマーを使用して、第1鎖cDNAの合成を指示し、次いでこれをポリメラーゼ連鎖反応の鋳型として直接使用することができる。RNAの一般的な調製のために、プライマーはまた、方法に応じて、ランダムまたはアッセイ/標的特異的であり得る。

10

【 0 0 6 9 】

PCRアッセイは、RNA (例えばHBV pgRNA) またはDNA (cDNA) 等の核酸を用いることができる。鋳型核酸は精製される必要はなく、ヒト細胞に含まれるHBV核酸等の複合混合物の微量画分であり得る。HBV核酸分子は、*Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications* (Persing et al. (eds), 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C.) に記載されているもの等の日常的な技術によって生物学的サンプルから抽出され得る。核酸は、任意の数の供給源、例えばプラスミド、または、細菌、酵母、ウイルス、細胞小器官、または植物もしくは動物などの高等生物を含む天然供給源から得ることができる。

20

【 0 0 7 0 】

オリゴヌクレオチドプライマー (例えば、配列番号20、23、24、210、213、214、387および389を含むフォワードプライマー、および配列番号16、18、19、25~30、33~190、206、208、209、215~220および223~380を含むRT/リバープライマー) を、プライマー伸長を誘導する反応条件下でPCR試薬と組み合わせる。例えば、鎖伸長反応には、一般的に、50mM KCl、10mM Tris-HCl (pH 8.3)、15mM MgCl₂、0.001% (w/v) ゼラチン、0.5~1.0 μgの変性された鋳型DNA、50pmolの各オリゴヌクレオチドプライマー、2.5UのTaqポリメラーゼおよび10%DMSO) が含まれる。反応物は、通常、それぞれ150~320 μMのdATP、dCTP、dTTP、dGTP、またはそれらの1つまたは複数の類似体を含む。

30

【 0 0 7 1 】

新規に合成された鎖は、反応の後続工程で使用できる二本鎖分子を形成する。標的HBV核酸分子 (HBV RNA、例えばHBV pgRNAを含む) に対応する所望の量の増幅産物を生成するために、鎖分離、アニーリング、および伸長の工程を必要に応じて何度でも繰り返すことができる。反応の制限因子は、反応中に存在するプライマー、熱安定性酵素、およびヌクレオシド三リン酸の量である。サイクリング工程 (すなわち、変性、アニーリング、および伸長) は、好ましくは少なくとも1回繰り返される。検出での使用では、サイクリング工程の数は、例えば、サンプルの性質による。サンプルが核酸の複雑な混合物である場合、検出に十分な標的配列を増幅するために、より多くのサイクリング工程が必要となる。一般的に、サイクリング工程は少なくとも約20回繰り返されるが、40、60、または100回繰り返してもよい。

40

蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)

【 0 0 7 2 】

FRET技術 (例えば、米国特許第4,996,143号、同第5,565,322号、同第5,849,489号、および同第6,162,603号を参照) は、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター蛍光部分が互いに一定の距離内に配置されると、2つの蛍光部分間でエネルギー移動が生じ、それを可視化することができ、または他の方法で検出および/または定量することができるという概念に基づいている。典型的に、ドナーは

50

好適な波長の光照射によって励起されると、アクセプターにエネルギーを移動させる。典型的に、アクセプターは移動されたエネルギーを異なる波長の光照射の形態で再発光する。特定の系では、非蛍光エネルギーは、実質的に非蛍光のドナー部分（例えば、米国特許第7,741,467号を参照）を含む生体分子を介して、ドナー部分とアクセプター部分との間で移動され得る。

【0073】

一例では、オリゴヌクレオチドプローブは、ドナー蛍光部分（例えば、FAM）と、蛍光性であってもなくてもよく、光以外の形態で伝達されたエネルギーを散逸させる対応するクエンチャー（例えば、Black Hole Quencher（商標）（BHQ）（例えば、BHQ2））とを含有することができる。プローブがインタクトである場合、エネルギー移動は、典型的には、ドナー蛍光部分からの蛍光発光がアクセプター部分によってクエンチされるように、ドナー部分とアクセプター部分との間で起こる。ポリメラーゼ連鎖反応の伸長工程中、増幅産物に結合したプローブは、ドナー蛍光部分の蛍光発光がもはやクエンチされないように、例えばTaqポリメラーゼの5'から3'ヌクレアーゼ活性によって切断される。この目的のための例示的なプローブは、例えば、米国特許第5,210,015号、同第5,994,056号、および同第6,171,785号に記載されている。一般的に使用されるドナー-アクセプター対は、FAM-TAMRA対を包含する。一般的に使用されるクエンチャーは、DABCYLおよびTAMRAである。一般的に使用されるダーク・クエンチャーは、Black Hole Quenchers（商標）（BHQ）（例えば、BHQ2）、（Biosearch Technologies, Inc., カリフォルニア州ノヴァト）、Iowa Black（商標）（Integrated DNA Tech., Inc., アイオワ州コーラルビル）、Black Berry（商標）Quencher 650（BBQ-650）（Berry & Assoc, ミシガン州デクスタ）を包含する。

【0074】

他の例では、それぞれが蛍光部分を含有する2つのオリゴヌクレオチドプローブは、HBV RNA標的RNA標的核酸配列（HBV RNA、例えばpgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA）に対するオリゴヌクレオチドプローブの相補性によって決定される特定の位置で増幅産物にハイブリダイズすることができる。オリゴヌクレオチドプローブが適切な位置で増幅産物核酸にハイブリダイゼーションすると、FRETシグナルが生成される。ハイブリダイゼーション温度は、約10秒間~約1分間、約35~約65の範囲であり得る。

【0075】

蛍光分析は、例えば、光子計数落射蛍光顕微鏡システム（適切なダイクロイックミラーおよび特定の範囲の蛍光発光を監視するためのフィルタを備える）、光子計数光電子増倍管システム、または蛍光光度計を使用することができる。エネルギー移動を開始するため、または蛍光体の直接検出を可能にするための励起は、アルゴンイオンレーザー、高強度水銀（Hg）アークランプ、キセノンランプ、光ファイバー光源、または所望の範囲の励起のために適切にフィルタリングした他の高強度光源を用いて行うことができる。

【0076】

ドナー部分および対応するアクセプター部分に関して本明細書で使用される場合、「対応する」とは、ドナー蛍光部分の発光スペクトルと重複する吸光度スペクトルを有するアクセプター蛍光部分またはダーク・クエンチャーを指す。アクセプター蛍光部分の発光スペクトルの波長最大値は、ドナー蛍光部分の励起スペクトルの波長最大値よりも少なくとも100nm大きくなければならない。したがって、それらの間で効率的な非照射エネルギー移動を行うことができる。

【0077】

蛍光ドナー部分および対応するアクセプター部分は、一般的に、(a)高効率Försterエネルギー移動、(b)大きな最終ストークスシフト(>100nm)、(c)可能な限り可視スペクトルの赤色部分(>600nm)への発光のシフト、および(d)

10

20

30

40

50

ドナー励起波長での励起によって生じるラマン水蛍光発光よりも高い波長への発光のシフトのために選択される。例えば、ドナー蛍光部分は、レーザー線付近のその最大励起波長（例えば、ヘリウム - カドミウム 442 nm または アルゴン 488 nm）、高い吸光係数、高い量子収率、および、その蛍光発光の対応するアクセプター蛍光部分の励起スペクトルとの良好な重複を有するものを選択することができる。対応するアクセプター蛍光部分は、高い吸光係数、高い量子収率、ドナー蛍光部分の発光とのその励起の良好な重複、および可視スペクトルの赤色部分（> 600 nm）の発光を有するものを選択することができる。

【0078】

FRET 技術において様々なアクセプター蛍光部分と共に使用することができる代表的なドナー蛍光部分としては、フルオレセイン、ルシファーイエロー、B-フィコエリトリン、9-アクリジンイソチオシアネート、ルシファーイエロー-VS、4-アセトアミド-4'-イソチオシアナトスチルベン-2,2'-ジスルホン酸、7-ジエチルアミノ-3-(4'-イソチオシアナトフェニル)-4-メチルクマリン、スクシンミル1-ピレンブチレート、および4-アセトアミド-4'-イソチオシアナトスチルベン-2,2'-ジスルホン酸誘導体が挙げられる。代表的なアクセプター蛍光部分としては、使用されるドナー蛍光部分に応じて、LC Red 640、LC Red 705、Cy5、Cy5.5、リサミンローダミンBスルホニルクロリド、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、ローダミンXイソチオシアネート、エリスロシンイソチオシアネート、フルオレセイン、ジエチレントリアミンペンタアセテート、またはランタニドイオンの他のキレート（例えば、ユウロピウム、またはテルビウム）が挙げられる。ドナー蛍光部分およびアクセプター蛍光部分は、例えば、Molecular Probes（オレゴン州ジャンクションシティ）またはSigma Chemical Co.（ミズーリ州セントルイス）から得ることができる。

【0079】

ドナー蛍光部分およびアクセプター蛍光部分を、リンカーアームを介して適切なプローブオリゴヌクレオチドに結合することができる。リンカーアームはドナー蛍光部分とアクセプター蛍光部分との間の距離に影響を及ぼすため、各リンカーアームの長さは重要である。リンカーアームの長さは、ヌクレオチド塩基から蛍光部分までのオングストローム（ \AA ）の距離であり得る。一般的に、リンカーアームは約10 ~ 約25 である。リンカーアームは、国際公開第84/03285号に記載されている種類のものであってもよい。国際公開第84/03285号はまた、リンカーアームを特定のヌクレオチド塩基に結合させる方法、および蛍光部分をリンカーアームに結合させる方法も開示している。

【0080】

LC Red 640 等のアクセプター蛍光部分を、アミノリンカー（例えば、ABI（カリフォルニア州フォスターシティ）またはGlen Research（バージニア州スターリング）から入手可能なC6-アミノホスホラミダイト）を含有するオリゴヌクレオチドと組み合わせて、例えば、LC Red 640 標識オリゴヌクレオチドを生成することができる。フルオレセイン等のドナー蛍光部分をオリゴヌクレオチドに結合させるためによく使用されるリンカーとしては、チオ尿素リンカー（FITC由来、例えばGlen ResearchまたはChemGene（マサチューセッツ州アッシュランド）のフルオレセイン-CPG）、アミド-リンカー（BioGenex（カリフォルニア州サンラモン）のCX-フルオレセイン-CPG等の、フルオレセイン-NHS-エステル由来）、またはオリゴヌクレオチド合成後にフルオレセイン-NHS-エステルの結合を必要とする3'-アミノ-CPGが挙げられる。

B型肝炎ウイルス（HBV）増幅産物（アンプリコン）の検出

【0081】

本開示は、生物学的または非生物学的サンプル中のHBV RNA（例えば、HBV pg RNA等の転写されたcccDNA由来のHBV RNA）の存在または非存在を検出する方法を提供する。提供される方法は、サンプルの汚染、偽陰性、および偽陽性の問題

10

20

30

40

50

を回避する。上記方法は、1つまたは複数のHBVプライマー対を使用してサンプルからのHBV標的核酸分子(例えばHBV pgRNAを含む、cccDNAから転写されたHBV RNA)の一部を増幅することを含む少なくとも1つのサイクリング工程、およびFRET検出工程を実施することを含む。複数のサイクリング工程は、好ましくはサーモサイクラーで行われる。HBVプライマーおよびプローブを使用してHBV標的核酸分子(HBV pgRNAを含む、cccDNAから転写されたHBV RNA)の存在を検出する方法を実施することができ、HBV標的核酸分子(HBV pgRNAを含む、cccDNAから転写されたHBV RNA)の検出は、サンプル中のHBV標的核酸分子(HBV pgRNAを含む、cccDNAから転写されたHBV RNA)の存在を示す。

【0082】

10

本明細書に記載されるように、増幅産物は、FRET技術を利用する標識ハイブリダイゼーションプローブを使用して検出することができる。1つのFRETフォーマットは、TaqMan(登録商標)技術を利用して、増幅産物の存在または非存在、したがってHBVウイルス(特に、HBV核酸、例えばHBV RNA(例えば、HBV pgRNA))の存在または非存在を検出する。TaqMan(登録商標)技術は、例えば、1つの蛍光色素(例えばHEX)および1つのクエンチャー(例えばBHQ)で標識された1つの1本鎖ハイブリダイゼーションプローブを利用し、これは蛍光性であってもよく、そうでなくてもよい。第1の蛍光部分が適切な波長の光で励起されると、吸収されたエネルギーは、FRETの原理に従って第2の蛍光部分またはダーク・クエンチャーに移動する。第2の蛍光部分は、一般的には、クエンチャー分子である。PCR反応のアニーリング工程中、標識されたハイブリダイゼーションプローブは、標的DNA(すなわち、増幅産物)に結合し、その後の伸長段階中に、例えばTaqポリメラーゼの5'から3'ヌクレアーゼ活性によって分解される。その結果、蛍光部分とクエンチャー部分とが互いに空間的に分離される。結果として、クエンチャーの非存在下において第1の蛍光部分を励起すると、第1の蛍光部分からの蛍光発光を検出することができる。例として、ABI PRISM(登録商標)7700配列検出システム(Applied Biosystems)は、TaqMan(登録商標)技術を使用し、サンプル中のHBV標的核酸分子(HBV pgRNAを含むcccDNAから転写されたHBV RNA RNA)の存在または非存在を検出するための本明細書に記載の方法を実施するのに適している。

20

【0083】

30

FRETと組み合わせた分子ビーコンを使用して、リアルタイムPCR法を使用して増幅産物の存在を検出することもできる。分子ビーコン技術は、第1の蛍光部分および第2の蛍光部分で標識されたハイブリダイゼーションプローブを使用する。第2の蛍光部分は一般的にはクエンチャーであり、蛍光標識は典型的にはプローブの各端部に配置される。分子ビーコン技術は、二次構造形成を可能にする配列(例えば、ヘアピン)を有するプローブオリゴヌクレオチドを使用する。プローブ内で二次構造が形成された結果、プローブが溶液中にある場合、両方の蛍光部位が空間的に近接する。標的核酸(すなわち、増幅産物)へのハイブリダイゼーション後、プローブの二次構造が破壊され、蛍光部分が互いに分離され、それにより、適切な波長の光による励起後、第1の蛍光部分の発光を検出することができる。

40

【0084】

FRET技術の別の一般的な形式は、2つのハイブリダイゼーションプローブを利用する。各プローブは、異なる蛍光部分で標識することができ、一般的に、標的DNA分子(例えば、増幅産物)内で互いに近接してハイブリダイズするように設計される。ドナー蛍光部分、例えばフルオレセインは、LightCycler(登録商標)Instrumentの光源によって470nmで励起される。FRETの間、フルオレセインは、そのエネルギーをアクセプター蛍光部分、例えばLightCycler(登録商標)-Red640(LC Red640)またはLightCycler(登録商標)-Red705(LC Red705)に伝達する。次いで、アクセプター蛍光部分はより長い波長の光を放出し、これはLightCycler(登録商標)機器の光学検出システムによ

50

って検出される。効率的な FRET は、蛍光部分が直接局所的に近接しており、ドナー蛍光部分の発光スペクトルがアクセプター蛍光部分の吸収スペクトルと重なっている場合にのみ起こり得る。放出されたシグナルの強度は、元の標的 RNA または DNA 分子の数（例えば、HBV pgRNA 等の HBV RNA 転写物の数）と相関していてもよい。HBV 標的核酸（HBV RNA、例えば HBV pgRNA を含む）の増幅が起こり、増幅産物が産生される場合、ハイブリダイズ工程によって、プローブ対のメンバー間の FRET に基づく検出可能なシグナルがもたらされる。

【0085】

一般的に、FRET の存在は、サンプル中の HBV RNA（HBV pgRNA を含む、cccDNA から転写された HBV RNA）の存在を示し、かつ、FRET の非存在は、サンプル中の HBV RNA 分子（HBV pgRNA を含む、cccDNA から転写された HBV RNA）の非存在を示す。しかしながら、不十分な検体収集、輸送遅延、不適切な輸送条件、または特定の収集スワブ（アルギン酸カルシウムまたはアルミニウムシャフト）の使用はいずれも、試験結果の成功および/または精度に影響を及ぼし得る条件である。

10

【0086】

本方法の実施に使用することができる代表的な生物学的サンプルとしては、呼吸器検体、尿、糞便検体、血液検体、血漿、血清、皮膚スワブ、鼻スワブ、創傷スワブ、血液培養物、乾燥血液スポット、皮膚および軟部組織感染物が挙げられるが、これらに限定されない。他の生物学的サンプルは、細胞培養物および血漿分離カードまたは乾燥血液スポットを含み得る。生物学的サンプルの収集および保存方法は、当技術分野の当業者に知られている。生物学的サンプルを（例えば、当技術分野で知られている核酸抽出方法および/またはキットによって）処理して核酸（HBV pgRNA を含む、cccDNA から転写された HBV RNA）を放出させることができ、または一部の 경우에는、生物学的サンプルを PCR 反応成分および適切なオリゴヌクレオチドと直接接触させることができる。

20

【0087】

融解曲線分析は、サイクルプロファイルに含めることができる追加の工程である。融解曲線分析は、DNA 二本鎖の半分が一本鎖に分離した温度として定義される融解温度（ T_m ）と呼ばれる特徴的な温度で DNA が融解するという事実に基づいている。DNA の融解温度は、主にそのヌクレオチド組成に依存する。したがって、G および C ヌクレオチドが豊富な DNA 分子は、A および T ヌクレオチドが豊富な DNA 分子よりも高い T_m を有する。シグナルが失われる温度を検出することにより、プローブの融解温度を決定することができる。同様に、シグナルが発生する温度を検出することにより、プローブのアニール温度を決定することができる。HBV 増幅産物からの HBV プローブの融解温度（複数可）により、サンプル中の HBV の有無を確認し得る。

30

【0088】

各サーモサイクラーランの間に、対照サンプルも同様にサイクルすることができる。陽性対照サンプルは、例えば、対照プライマーおよび対照プローブを使用して、（記載された標的遺伝子の増幅産物以外の）標的核酸対照鋳型を増幅することができる。陽性対照サンプルはまた、例えば、標的核酸分子を含むプラスミド構築物を増幅することができる。そのようなプラスミド対照は、意図された標的の検出に使用されるのと同じプライマーおよびプローブを使用して、内部で（例えば、サンプル中で）または患者のサンプルと並んで実行される別々のサンプルランで増幅することができる。そのような対照は、増幅、ハイブリダイゼーションおよび/または FRET 反応の成功または失敗の指標である。各サーモサイクラーランはまた、例えば、標的鋳型 DNA を欠く陰性対照を含むことができる。陰性対照は汚染を測定することができる。これにより、システムおよび試薬が偽陽性シグナルを生じないことが保証される。したがって、対照反応は、例えば、プライマーが配列特異性によりアニールし、伸長を開始する能力、並びにプローブが配列特異性によりハイブリダイズし、FRET が発生する能力を容易に決定することができる。

40

【0089】

50

一実施形態において、本方法は、汚染を回避する工程を含む。例えば、ウラシル - DN A グリコシラーゼを利用する酵素的方法は、あるサーモサイクラーンと次のサーモサイクラーンとの間の汚染を低減または排除するために、米国特許第 5, 035, 996 号、同第 5, 683, 896 号および同第 5, 945, 313 号に記載されている。

【0090】

FRET 技術と組み合わせた従来の PCR 法を使用して、この方法を実施することができる。一実施形態において、Light Cycler (登録商標) 機器が使用される。以下の特許出願、国際公開題 97/46707 号、同第 97/46714 号、および同第 97/46712 号には、Light Cycler (登録商標) 技術で使用されるリアルタイム PCR が記載されている。

10

【0091】

Light Cycler (登録商標) は、PC ワークステーションを使用して操作することができる。サンプルからのシグナルは、機械が光学ユニット上にキャピラリーを順次配置するときにも得られる。ソフトウェアは、各測定の後リアルタイムで蛍光シグナルを表示することができる。蛍光取得時間は 10 ~ 100 ミリ秒 (msec) である。各サイクリング工程の後、蛍光対サイクル数の定量的表示を、全てのサンプルについて連続的に更新することができる。生成されたデータは、さらなる分析のために保存することができる。

【0092】

Light Cycler (登録商標) 480 II Real-Time PCR System は、PC ワークステーションを使用して操作することもできる。機器はサーマルブロックサイクラーを有し、ペルチェ素子を使用して加熱および冷却が達成される。サンプルからの蛍光シグナルは、広域スペクトルにわたって光を発する高強度キセノンランプを使用して 96 ウェルプレートから得られる。特定の励起および発光のための内蔵フィルタの柔軟な組合せによって、様々な蛍光色素および検出フォーマットの使用が可能になる。ソフトウェアは、蛍光シグナルを表示し、CT 値を計算することができ、生成されたデータは、さらなる分析のために保存することができる。

20

【0093】

FRET の代替として、蛍光 DNA 結合色素 (例えば、SYBR (登録商標) Green または SYBR (登録商標) Gold (Molecular Probes)) 等の二本鎖 DNA 結合色素を用いて、増幅産物を検出することができる。二本鎖核酸との相互作用の際、このような蛍光 DNA 結合色素は、適当な波長の光で励起した後、蛍光シグナルを発する。また、核酸インターカレート色素等の二本鎖 DNA 結合色素を用いることもできる。二本鎖 DNA 結合色素を使用する場合、増幅産物の存在を確認するために、通常は融解曲線分析を行う。

30

【0094】

当業者は、他の核酸またはシグナル増幅方法も使用され得ることを理解するであろう。そのような方法の例としては、分岐 DNA シグナル増幅、ループ媒介等温増幅 (LAMP)、核酸配列ベース増幅 (NASBA)、自立配列複製 (3SR)、鎖置換増幅 (SDA)、またはスマート増幅プロセスバージョン 2 (SMAP2) が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0095】

本開示の実施形態は、1 つまたは複数の市販の機器の構成によって限定されないことが理解される。

製品 / キット

【0096】

本開示の実施形態はさらに、HBV RNA (例えば、HBV pg RNA 等の ccc DNA から転写された HBV RNA) を検出するための製品またはキットを提供する。製品は、適切な包装材料と共に、HBV RNA (例えば、HBV pg RNA 等の ccc DNA から転写された HBV RNA) 標的を検出するために使用されるプライマーおよび

50

プローブを含むことができる。HBV pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNAを含むHBV RNAを検出するための代表的なプライマーおよびプローブは、HBV標的核酸分子(HBV pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA)にハイブリダイズすることができる。さらに、キットはまた、固体支持体、緩衝液、酵素およびDNA標準のような、DNA固定化、ハイブリダイゼーションおよび検出に必要な適切に包装された試薬および材料を含み得る。プライマーおよびプローブを設計する方法は本明細書に開示されており、HBV標的核酸分子(HBV RNA、例えばHBV pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNA)を増幅してハイブリダイズするプライマーおよびプローブの代表的な例が提供される。

【0097】

製品はまた、プローブを標識するための1つまたは複数の蛍光部分を含むことができるか、あるいは、キットと共に供給されるプローブを標識することができる。例えば、製品は、HBVプローブ(HBV pgRNA等のHBV RNAを標的とするプローブを含み得る)を標識するためのドナーおよび/またはアクセプター蛍光部分を含み得る。好適なFRETドナー蛍光部分および対応するアクセプター蛍光部分の例を上提供する。

【0098】

製品はまた、サンプル中のHBV(HBV pgRNA等のHBV RNAを含む)を検出するプライマーおよびプローブを使用するための説明書を有する添付文書または包装ラベルを含むことができる。製品は、本明細書に開示される方法を実施するための試薬(例えば、緩衝液、ポリメラーゼ酵素、補因子、または汚染を防止するための薬剤)をさらに含み得る。そのような試薬は、本明細書に記載の市販の機器の1つに特異的であり得る。

【0099】

本開示の実施形態はまた、サンプル中のHBV pgRNA等のcccDNAから転写されたHBV RNAを含むHBV RNAを検出するためのプライマーセットおよび1つまたは複数の検出可能なプローブを提供する。他のポリA部位、例えば、組み込まれたHBVコピーに由来し得るHBV転写物の二次または切断ポリA部位を標的とする、さらなるプライマーおよびプローブを提供することができる。

【0100】

本開示の実施形態は、特許請求の範囲に記載される発明の範囲を限定しない以下の実施例においてさらに説明される。

【実施例】

【0101】

以下の実施例および図面は、主題の理解を助けるために提供されており、その主題の真の範囲は、添付の特許請求の範囲に記載されている。本発明の要旨から逸脱することなく、記載された手順に変更を加え得ることが理解される。

【0102】

HBVの標的領域には、pgRNA等のHBV RNAが含まれる。全ての核酸配列を整理させ、全てのプライマーおよびプローブを考慮し、全ての公知のHBV分離株および他の特性について予測される包括性についてスコア化した。

実施例1：HBV RNAポリA標的アッセイの設計

【0103】

HBV RNAポリA標的アッセイは、図1および図2に示すようにRTプライマー(リバースプライマーとして使用される)を使用して設計した。標的は、図1および図2に示すように、HBV RNA(例えば、HBV pgRNAを含む標準的なポリAテールを有するHBV cccDNAに由来するHBV RNA)である。アッセイは、ポリAテールを含有するスプライスパリアントおよびmRNAを含む他のRNAも検出することができる。RTプライマーは、リバースプライマーとしても作用することができ、標的mRNAのポリAテールに結合するためのポリT部分を有する(例えば、図1および2に示すようなHBV pgRNA)。RTプライマーのHBV特異的配列は、HBVに特異性を提供し、ヒトおよび他のポリAテールRNAまたはゲノム中のホモポリマーの伸長部へのR

10

20

30

40

50

T / リバースプライマー結合を減少させるように設計されているが、HBV 特異的配列が長いほど、HBV DNA に結合する可能性が高くなる。実際、短いHBV 特異的配列であっても、DNA が高濃度である場合、オフターゲット（すなわち、望ましくない）HBV DNA を増幅する能力が実証されている。RT オリゴにタグ配列を任意に付加することができ、その結果、より効率的なPCR 増幅のために異なる非HBV 配列リバースプライマー設計を使用することができるようになっている。

【0104】

競合的ブロックオリゴヌクレオチドの概念を組み込んで、ポリA 検出セットのRT プライマー / リバースプライマーの代わりにHBV DNA ゲノムに優先的に結合することによって、HBV DNA の増幅を減少させた（図2を参照されたい）。この競合的ブロックオリゴヌクレオチドは、非伸長性であるように設計されているため、プライマーとして作用しない。これは、例えば、3' 末端にC3 スペースを付加することによって達成される（リン酸基または他の結合基または改変も同じ目的のために使用し得る）。この実施例において、競合的ブロックオリゴヌクレオチド添加によって、その意図された標的に対するアッセイの特異性を増加させることが示されている。この概念は、本実施例ではHBV RNA のポリA 標的に適用されるが、他の標的のための他のポリA 設計、または他の競合的鑄型または干渉状況、例えば、DNA ゲノムも増幅されることを可能にする短いイントロンを有するスプライシングされたRNA 標的、パラログ遺伝子または標的に関連する偽遺伝子を有する状況、または1つが標的化され、他は標的化されない混合遺伝子型もしくは関連生物を有するサンプルに適用可能であり得る。

【0105】

本開示の全ての例において、HBV RNA を検出および増幅するために使用されたポリメラーゼは、Z05Dとして知られる改変Thermus Z05ポリメラーゼであった。Z05D改変ポリメラーゼは、野生型Thermus Z05ポリメラーゼ配列の配列を有するが、米国特許第8,962,293号に記載されているように、D580G改変を有する。Z05Dポリメラーゼは、逆転写酵素（RT）およびポリメラーゼ（DNA増幅）の両方の能力を有する核酸ポリメラーゼである。用語「核酸ポリメラーゼ」は、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素（RT）、DNA依存性ポリメラーゼ、RNA依存性ポリメラーゼ、ならびに逆転写酵素（RT）およびポリメラーゼ（DNA増幅）能力を示すポリメラーゼ、例えば本開示の例で使用されるZ05Dポリメラーゼを含む、核酸をポリメラーゼすることができる任意のポリメラーゼ酵素を指す。逆転写酵素（RT）およびポリメラーゼ（DNA増幅）能力を示す任意のポリメラーゼを本開示で使用して、HBV RNA を検出および増幅することができる。

実施例2：競合的ブロックオリゴヌクレオチドを用いたHBV RNA ポリA 標的アッセイの感度および線形範囲

【0106】

HBV RNA ポリA 標的アッセイは、競合的ブロックオリゴヌクレオチドの存在下において、HBV pgRNA 3' 末端ポリA 標的を用いて、図1および図2に示すようにRT プライマー（リバースプライマーとして使用される）を使用して設計した。アッセイの感度および線形範囲を確認した（図3）。

【0107】

リアルタイムPCRアッセイに使用したサンプルは、ポリAテール配列を含むHBV pgRNA 3' 末端コンストラクトの配列を含む外装RNAのコピーであった。鑄型を様々な濃度（ 1×10^0 コピー/mL、 1×10^1 コピー/mL、 1×10^2 コピー/mL等、最大 1×10^9 コピー/mL）で陰性ヒト血漿に添加し、抽出し、コバルト（登録商標）6800/8800でのPCR反応に溶出した。使用される試薬には、cobas（登録商標）6800/8800と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有するcobas（登録証用）6800/8800汎用PCR Master Mix、およびTaqMan（登録商標）増幅および検出技術を使用することが含まれる。

【0108】

10

20

30

40

50

リアルタイムPCRアッセイに使用したHBV pgRNAに特異的なオリゴヌクレオチドは、フォワードプライマー（配列番号387）およびプローブ（配列番号388）と共に、RT/リバースプライマーHBV_PA-V_5LNA_25_351（配列番号152）およびHBV_PA-V_5LNA_25_351_MIX（配列番号151）であった。HBV RNA配列の3'末端における共通の置換がいくつかのプライマー設計の性能に影響を及ぼし得るため、この実験およびいくつかの他の実験においては2つのリバースプライマーが使用される。バリエーションをカバーする塩基変化を有する対になったプライマーは、サンプル中のこの置換の潜在的影響を低下させる。したがって、1つのリバースプライマーの代わりに2つのリバースプライマーを使用することにより、HBV RNA配列の3'末端で一般的に観察される置換を有するバリエーションへのハイブリダイゼーションが可能になる。すなわち、ただ1つのリバースプライマーの代わりに1つを超える（すなわち、2つの）リバースプライマーを使用することによって、HBV RNA配列の3'末端における一般的な置換の複雑さが克服される。一般的に、複数の変異（一般的または稀な変異、置換、または他の変異型を含む）をカバーするために複数のプライマーを使用することが有用であり得る。競合的ブロックオリゴヌクレオチド「25-1」（配列番号11）を、内部対照のオリゴヌクレオチド（図示せず）と同様にマスターミックスに含めた。結果を、以下の表4に示す。

10

【表4】

種類	配列番号	配列	改変
RT/R.プライマー	152	GATCAACGTGTCACCGCCTATTCTAT<D_LNA_T>TTT<D_LNA_T>TTT<D_LNA_T>T<D_LNA_T>TGAAGCTC	
RT/R.プライマー	151	GATCAACGTGTCACCGCCTATTCTAT<D_LNA_T>TTT<D_LNA_T>TTT<D_LNA_T>T<D_LNA_T>TGTAGCTC	
F.プライマー	387	CATGCAACTTTTTACCTCTGCCTF	F=5-メチルdC
プローブ	388	ECCAAGCTGTGCCTTGGJGTGGFLLGGGGFALGGP	E=hex, J=BHQ-2, F=5-メチルdC, L=5-プロピニルdU, P=リン酸
ブロックオリゴ	11	GAGAG<pdU>AA<5_Me_dC><pdU><5_Me_dC><5_Me_dC>A<5_Me_dC>AGAAG<5_Me_dC>T<5_Me_dC>CAA<pdU>TC<SpC_C3>	

20

30

【0109】

データは、ポリAテールを有するHBVポリA部位配列を含むHBV pgRNA転写物に対するポリA標的PCRアッセイ設計の一例の性能を示す。図3に示す結果は、アッセイの線形範囲ならびに感度を反映して、（用量依存的な様式で）多量の出発HBV pgRNA転写物によるより大きなアンプリコン産生を示す。

40

【0110】

したがって、図3に示すこれらの結果は、リアルタイムPCRアッセイにおいて、プライマー、競合的ブロックオリゴヌクレオチド、およびプローブ（配列番号11、151、152、387および388）がHBV pgRNA 3の存在を検出することを実証する、リアルタイムシングルプレックスPCR成長曲線を示す。

実施例3：競合的ブロックオリゴヌクレオチドを用いたHBV RNAポリA標的アッセイの特異性

【0111】

HBV RNAポリA標的アッセイは、HBV pgRNA標的を用いて、図1および図2に示すようにRTプライマー（リバースプライマーとして使用される）を使用して設計

50

した。アッセイの特異性を、HBV DNAのみのサンプルであるサンプルに対するPCR蛍光シグナルによって確認した。

【0112】

反応は、HBV DNA鋳型（外装DNA）上で25万IU/rxnで行い、抽出および処理工程前のサンプル中の100万IU/mLのインプットと同等であると推定された。リアルタイムPCRアッセイに使用したHBV RNAに特異的なオリゴヌクレオチドは、HBV特異的なフォワードプライマー（配列番号387）およびプローブ（配列番号388）と共に、RT/リバープライマーHBV_PA-Z_5LNA_25_351_MIX（配列番号96）であった。競合的ブロックオリゴヌクレオチド「25-1」（配列番号11）を用いて、および用いずに、同じマスターミックスをランした。結果を、以下の表5に示す。

10

【表5】

種類	配列番号	配列	改変
RT/R.プライマー	96	GATCAACGTGTCACCGCCTATTCTAT<LNA-T>TTT<LNA-T>TTT<LNA-T>TTT<LNA-T>T<LNA-T>TGTAGC	
F.プライマー	387	CATGCAACTTTTTACCTCTGCCTF	F=5-メチルdC
プローブ	388	ECCAAGCTGTGCCTTGGJGTGGFLLLGGGGFALGGP	E=hex、J=BHQ-2、F=5-メチルdC、L=5-プロピニルdU、P=プリン酸
ブロックオリゴ	11	GAGAG<pdU>AA<5_Me_dC><pdU><5_Me_dC><5_Me_dC>A<5_Me_dC>AGAAG<5_Me_dC>T<5_Me_dC>CAAA<pdU>TC<SpC_C3>	

20

【0113】

アッセイ比較をLC480 PCR機器で行った。使用される試薬には、cobas（登録商標）6800/8800と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有するcobas（登録証用）6800/8800汎用PCR Master Mix、およびTaqMan（登録商標）増幅および検出技術を使用することが含まれる。マスターミックス中のオリゴヌクレオチドの最終濃度は、150nM~300nMの範囲であった。結果は、ブロッカーなしのRTプライマーの存在下におけるアンプリコンが産生されること（オフターゲットDNA増幅）、およびRTプライマーおよび競合的ブロックオリゴヌクレオチドの存在下でアンプリコンが産生されないことを示す。

30

【0114】

図4に示すこれらの結果は、HBV RNAポリA標的のアッセイに対するHBV DNAに対する特異性、およびマスターミックス中の競合的ブロックオリゴヌクレオチドを含む可能性のある改善を実証する。したがって、HBV RNAポリA標的のアッセイは、HBV RNAに特異的であり、HBV DNAに特異的である。

実施例4：競合的ブロックオリゴヌクレオチドを用いたHBV RNAポリA標的のアッセイの特異性および混合鋳型結果

40

【0115】

HBV RNAポリA標的のアッセイは、HBV pgRNA標的を用いて、図1および図2に示すようにRTプライマー（リバープライマーとして使用される）を使用して設計した。アッセイの特異性は、CT値によって反映されるように、HBV RNA（標的）およびHBV DNA（非標的）鋳型が混合されたサンプルに対するPCR性能によって確認した。

【0116】

シングルプレックスリアルタイムPCRアッセイに使用したサンプルは、 1×10^3 転写物/rxnのHBV pgRNA転写物のコピーおよび様々なレベルのHBV DNAコン

50

ストラクト（図5のx軸に示す）であった。RNAアッセイは、転写物上のポリA部位を検出し、DNAの拾い上げに耐性があるように設計され、RNA標的に対する特異性を高めるために、いくつかの条件（図5の説明文に示されている）において競合ブロックオリゴヌクレオチドをアッセイに添加する。リアルタイムPCRアッセイに使用したHBV RNAに特異的なオリゴヌクレオチドは、HBV特異的なフォワードプライマー（配列番号387）およびプローブ（配列番号388）と共に、RT/リバースプライマーHBV__PA-Z__25__351（配列番号43）であった。競合的ブロックオリゴヌクレオチドHBVpA__block2（配列番号2）を用いて、および用いずに、同じマスターミックスをランした。

【0117】

混合サンプルおよびRNAアッセイ（図5では、それぞれ正方形およびXマーカとして示されている）のC_T値は、最大 1×10^6 コピーのDNAのRNAのみの結果（DNAインプットを増加させたにも関わらず、閾値までのシグナルがRNAのみからであり、DNA交差反応からの寄与は有意ではないことを示す）（図5参照）と一致した。使用した対照は、混合サンプルでのDNAアッセイ（図5の円）であり、予想されるように、より高いDNAインプットによる初期のC_Tを示す。

【0118】

図5に示すこれらの結果は、HBV RNAポリA標的のアッセイに対するHBV RNAに対する特異性、およびマスターミックス中の競合的ブロックオリゴヌクレオチドを含む可能性のある改善を実証する。したがって、HBV RNAポリA標的のアッセイは、HBV RNAおよびHBV DNAに特異的である（最大がHBV DNAの特定の力価）。

実施例5：競合的ブロックオリゴヌクレオチドを用いたHBV RNAポリA標的のアッセイの特異性および混合鑄型蛍光結果

【0119】

HBV RNAポリA標的のアッセイは、HBV pg RNA標的を用いて、図1および図2に示すようにRTプライマー（リバースプライマーとして使用される）を使用して設計した。アッセイの特異性は、HBV RNA（標的）およびHBV DNA（非標的）鑄型が混合されたサンプルまたはHBV DNAのみのサンプルに対するPCR蛍光シグナルによって確認した。

【0120】

シングルプレックスリアルタイムPCRアッセイに使用したサンプルは、 1×10^3 転写物/rxnのHBV pg RNA転写物のコピーおよび様々なレベルのHBV DNAコンストラクト（図6のx軸に示す）であった。RNAアッセイは、転写物上のポリA部位を検出し、DNAの拾い上げに耐性があるように設計され、RNA標的に対する特異性を高めるために、いくつかの条件（図6の説明文に示されている）において競合ブロックオリゴヌクレオチドを添加する。使用したオリゴは、実施例4と同じである。すなわち、リアルタイムPCRアッセイに使用したHBV RNAに特異的なオリゴヌクレオチドは、HBV特異的なフォワードプライマー（配列番号387）およびプローブ（配列番号388）と共に、RT/リバースプライマーHBV__PA-Z__25__351（配列番号43）であった。競合的ブロックオリゴヌクレオチドHBVpA__block2（配列番号2）を用いて、および用いずに、同じマスターミックスをランした。混合サンプルおよびRNAアッセイ（図6では、それぞれ正方形およびXマーカとして示されている）の相対蛍光強度（RFI）は、最大 1×10^6 コピーのDNA（閾値までのシグナルがRNAのみからであり、DNA交差反応からの有意ではない寄与を有することを示す）と一致した（図6参照）。DNAのみのサンプル（三角マーカによって示される）は、 1×10^5 コピー/rxn DNA未満で脱落し、RNAアッセイがその濃度のDNA未満では交差反応しないことを示している（図6参照）。DNAのみの検出は、RNAアッセイ（図6のダイヤモンドマーカによって示されている）を用いて競合的ブロックオリゴヌクレオチドを使用した場合、 1×10^6 コピー/rxn以下で脱落し、これは競合的ブロックオリゴヌクレオチドとの特異性の上昇を示す（図6参照）。使用した対照はDNAアッセイ（図6に

10

20

30

40

50

円として示されている)であり、DNAインプットレベルにわたって一貫した蛍光を示した(図6参照)。

【0121】

図6に示すこれらの結果は、HBV RNAポリA標的アッセイに対するHBV RNA(および特定の高さの力価のインプットまでのHBV DNA)に対する特異性、およびマスターミックス中の競合的ブロックオリゴヌクレオチドを含む可能性のある改善を実証する。したがって、HBV RNAポリA標的アッセイは、HBV RNAに特異的であり、HBV DNAに特異的である。

実施例6:競合的ブロックオリゴヌクレオチドを用いたHBV RNAポリA標的アッセイの特異性

【0122】

HBV RNAポリA標的アッセイは、HBV pgRNA標的を用いて、図1および図2に示すようにRTプライマー(リバープライマーとして使用される)を使用して設計した。アッセイの特異性を、HBV RNAのみのサンプルおよびHBV DNAのみのサンプルに対するPCR蛍光シグナルによって確認した。

【0123】

多重(内部対照(IC)反応を用いる)リアルタイムPCRアッセイを、ヒト血清中100コピー/mLのHBV外装RNAで試験し、抽出して、cobas(登録商標)6800/8800のPCR反応に溶出した。競合的ブロックオリゴヌクレオチドなし、および競合的ブロックオリゴヌクレオチドを含む両方でアッセイを試験した。リアルタイムPCRアッセイに使用したHBV RNAに特異的なオリゴヌクレオチドは、HBV特異的なフォワードプライマー(配列番号387)およびプローブ(配列番号388)と共に、RT/リバープライマーHBV_PA-V_5LNA_25_351(配列番号152)およびHBV_PA-V_5LNA_25_351_MIX(配列番号151)であった。競合的ブロックオリゴヌクレオチド「25-1」(配列番号11)を、内部対照のオリゴヌクレオチド(図示せず)と同様にマスターミックスに含めた。使用される試薬には、cobas(登録商標)6800/8800と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有するcobas(登録証用)6800/8800汎用PCR Master Mix、およびTaqMan(登録商標)増幅および検出技術を使用することが含まれる。マスターミックス中のオリゴヌクレオチドの最終濃度は、150nM~1μMの範囲であった。

【0124】

競合的ブロックオリゴの存在または非存在は、RNA標的に対するアッセイの性能に影響を及ぼさなかった。競合的ブロックオリゴヌクレオチドの濃度レベルは、意図しない銹型に対する特異性を最大化するように、またはその意図する標的に対するアッセイの感度を維持するように調整することができる。

【0125】

同じ反応混合物を、ヒト血清中10万IU/mLのHBV DNA(外装DNA)でランし、抽出して、cobas(登録商標)6800/8800のPCR反応に溶出した。このレベルのDNAは低レベルの蛍光シグナルしか有していなかったが、これらのオフターゲットシグナルをコールしないように相対蛍光強度(RFI)カットオフを増加させる代替法を実証するために、競合的ブロックオリゴを含めて反応を行った。ブロッカーの存在下においてシグナルが除去されたため、最大10万IU/mLのDNAの存在下でRNAのアッセイの感度を高めることができた。

【0126】

図7に示すこれらの結果は、HBV RNAポリA標的アッセイに対するHBV RNA(および特定の高さの力価のインプットまでのHBV DNA)に対する特異性、およびマスターミックス中の競合的ブロックオリゴヌクレオチドを含む可能性のある改善を実証する。したがって、HBV RNAポリA標的アッセイは、HBV RNAに特異的であり、HBV DNAに特異的である。

10

20

30

40

50

実施例7：HBV RNAポリA標的アッセイにおけるプライマーの改変の効果

【0127】

HBV RNAポリA標的アッセイは、HBV pgRNA標的を用いて、図1および図2に示すようにRTプライマー（リバースプライマーとして使用される）を使用して設計した。RT/リバースプライマー設計を変化させた場合のアッセイの性能を、HBV RNAサンプルであるサンプルに対するPCR蛍光シグナルによって確認した。

【0128】

反応は、25コピー/rxnでHBV RNA鋳型（外装RNA）上で実行し、これは、125ng/rxnのヒトDNAのバックグラウンドで、抽出および処理工程前のサンプルにおける100コピー/mLのインプットと同等であると推定された。リアルタイムPCRアッセイに使用したHBV RNAに特異的なオリゴヌクレオチドは、HBV特異的なフォワードプライマー（配列番号387）およびプローブ（配列番号388）と共に、RT/リバースプライマーHBV_PA-W_8pdU_25_351_MIX（配列番号117）、HBV_PA-V_8pdU_25_351_MIX（配列番号116）、HBV_PA_8pdU_25_351_s2_MIX（配列番号112）、およびHBV_PA-Z_5LNA_25_351_MIX（配列番号96）であった。結果を、以下の表6に示す。

【表6】

種類	配列番号	配列	改変
RT/R.プライマー	117	GATCAACGTGTCACCGCCTATTCTAT<pdU>T<pdU>T<pdU>T<pdU><pdU><pdU><pdU>TTT<pdU>T<pdU>TGTAGCT	
RT/R.プライマー	116	GATCAACGTGTCACCGCCTATTCTA<pdU>T<pdU>T<pdU>U>T<pdU><pdU><pdU>TTT<pdU>T<pdU>TGTAGCTC	
RT/R.プライマー	112	GATCAACGTGTCACCGCCTTT<pdU>T<pdU>T<pdU>T<pdU>dU><pdU><pdU>TTT<pdU>T<pdU>TGTAGCTCC	
RT/R.プライマー	96	GATCAACGTGTCACCGCCTATTCTAT<LNA-T>TTT<LNA-T>TTT<LNA-T>TTT<LNA-T>T<LNA-T>TGTAGC	
F.プライマー	387	CATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTF	F=5-メチルdC
プローブ	388	ECCAAGCTGTGCCTTGGJGTGGFLLGGGGFALGGP	E=hex, J=BHQ-2, F=5-メチルdC, L=5-プロピニルdU, P=プリン酸

【0129】

アッセイ比較（内部対照（IC）反応を使用する）をLC 480 PCR機器で行った。使用される試薬には、cobas（登録商標）6800/8800と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有するcobas（登録証用）6800/8800汎用PCR Master Mix、およびTaqMan（登録商標）増幅および検出技術を使用することが含まれる。マスターミックス中のオリゴヌクレオチドの最終濃度は、150nM~300nMの範囲であった。結果は、全てのアッセイについてアンプリコン産生および蛍光シグナルを示すが、プライマーのポリT伸長部にpdU改変塩基を有する、ポリA接合部におけるより長いHBV重複配列を用いるアッセイは、より大きなシグナルを有した。プライマーのポリT伸長部中のLNA-T改変塩基を用いたアッセイも、ポリA接合部においてより長いHBV重複配列がなくても、より大きなシグナルを有した。

【0130】

図8に示されるこれらの結果は、RT/リバースプライマーの設計を調整すること、およびプライマーに異なる化学改変を含めることの性能効果を実証する。

実施例8：競合的ブロックオリゴヌクレオチドによるHBV RNA定量に対するHBV

DNAの効果

【0131】

HBV RNAポリA標的アッセイは、HBV pgRNA標的を用いて、図1および図2に示すようにRTプライマー（リバースプライマーとして使用される）を使用して設計した。アッセイの性能を、HBV RNAサンプルであるサンプルに対するPCR蛍光シグナルによって確認した。

【0132】

反応は、陰性ヒト血漿中の 1×10^9 から10コピー/mLのHBV RNAの希釈系列でHBV RNA鋳型（外装RNA）上で行った。リアルタイムPCRアッセイに使用したHBV RNAに特異的なオリゴヌクレオチドは、HBV特異的なフォワードプライマー（配列番号387）およびプローブ（配列番号388）と共に、RT/リバースプライマーHBV_PA-V_5_LNA_25_351（配列番号152）およびHBV_PA-V_5_LNA_25_351_MIX（配列番号151）であった。競合的ブロックオリゴヌクレオチド「25-1」（配列番号11）を、内部対照のオリゴヌクレオチド（図示せず）と同様にマスターミックスに含めた。

【0133】

多重（内部対照（IC）反応を用いる）リアルタイムPCRアッセイを、ヒト血漿中のHBV外装RNAで試験し、抽出して、cobas（登録商標）6800/8800のPCR反応に溶出した。競合的ブロックオリゴヌクレオチドを含むアッセイを試験した。混合濃度ノードごとに10の複製物を試験した。使用される試薬には、cobas（登録商標）6800/8800と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有するcobas（登録証用）6800/8800汎用PCR Master Mix、およびTaqMan（登録商標）増幅および検出技術を使用することが含まれる。マスターミックス中のオリゴヌクレオチドの最終濃度は、333 nM ~ 1 μMの範囲であった。

【0134】

図9に示す結果は、混合DNA + RNAサンプルの条件下における高いHBV DNAインプットの耐性を示す。DNAを添加しない場合、このアッセイは、 1×10^9 コピー ~ 10コピー/mLのHBV RNAの線形性を示す。HBV DNAを 1×10^9 IU/mLの高レベルで添加した場合、RNAアッセイは、100および10コピー/mLを除いては影響を受けず、DNA対RNA比は6.0 logを超える（1 IU/mL HBV DNAはDNA鋳型の5コピー/mL超に相当する）。

【0135】

並行実験では、 1×10^7 IU/mLのHBV DNAは、100コピー/mLではHBV RNA定量の精度に影響を及ぼさず、10コピー/mLではわずかな影響しか及ぼさないことが示され、HBV DNAとHBV RNAとの間の比が6 log以下である限り、アッセイがDNAインプットに耐性を示すことが確認された。

【0136】

したがって、実施例8は、DNAインプットに対するHBV RNAアッセイの高い耐性を実証する。これらのデータは、競合的ブロックオリゴヌクレオチドを含むHBV RNAアッセイが、多量の潜在的干渉/競合DNAの存在下においてさえ、HBV RNAに非常に特異的であることを実証している。

実施例9：RNAおよびDNAの増幅に対するリバースプライマーの長さおよび改変の効果

【0137】

HBV RNAポリA標的アッセイは、HBV pgRNA標的を用いて、図1および図2に示すようにRTプライマー（リバースプライマーとして使用される）を使用して設計した。RT/リバースプライマー設計を変化させた場合のアッセイの性能を、HBV RNAサンプルであるサンプルに対するPCR蛍光シグナルによって確認した。使用したRT/リバースプライマーは、配列番号94、96、116、117、119、121、123、124、151、153、155および157であり、使用したフォワードプライ

10

20

30

40

50

した。RT/リバープライマー設計を変化させた場合のアッセイの性能を、HBV RNAサンプルであるサンプルに対するPCR蛍光シグナルによって確認した。使用したRT/リバープライマーは、配列番号142、161、162、163、164、165、166、167、168、169、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189および190であり、使用したフォワードプライマーは配列番号387であり、使用したプローブは配列番号388であり、使用したブロックオリゴヌクレオチドは配列番号11であった。

【0141】

反応は、12.5 ng / rxn のヒトDNAのバックグラウンドにおいて、25コピー / rxn のHBV RNA 鋳型 (外装RNA) で行った。競合的ブロックオリゴヌクレオチドを含むアッセイを行った。

10

【0142】

アッセイ比較をLC 480 PCR機器で行った。使用される試薬には、cobas (登録商標) 6800 / 8800と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有するcobas (登録証用) 6800 / 8800汎用PCR Master Mix、およびTaqMan (登録商標) 増幅および検出技術を使用することが含まれる。内部対照も含めた。結果は、RNAに対する全てのアッセイについてのアンプリコン産生および蛍光シグナルを示す。しかしながら、オリゴに含まれる化学改変塩基の数および配置に応じてCt値に中程度の変動があってもよく、いくつかの配置は、他の配置よりも標的の増幅においてより効率的であると考えられる。

20

【0143】

以下の表に示されるこれらの結果は、RT/リバープライマーの設計を調整すること、およびプライマーに異なる化学改変を含めることの性能効果を実証する。表中、各プライマー設計について得られたCt値の範囲は以下の通りであった：

30

40

50

は配列番号 388 であり、使用したブロッキングオリゴヌクレオチドは配列番号 11 であった。

【0145】

反応は、12.5 ng / rxn のヒト DNA のバックグラウンドにおいて、25 コピー / rxn の HBV RNA 鋳型 (外装 RNA) で行った。競合的ブロックオリゴヌクレオチドを含むアッセイを行った。これらの実験では、実施例 10 とは配列が異なるバリエーション HBV 鋳型を使用した。

【0146】

アッセイ比較を LC 480 PCR 機器で行った。使用される試薬には、cobas (登録商標) 6800 / 8800 と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有する cobas (登録証用) 6800 / 8800 汎用 PCR Master Mix、および TaqMan (登録商標) 増幅および検出技術を使用することが含まれる。内部対照も含めた。結果は、RNA に対する全てのアッセイについてのアンプリコン産生および蛍光シグナルを示す。しかしながら、オリゴに含まれる化学改変塩基の数および配置に応じて Ct 値に中程度の変動があってもよく、いくつかの配置は、他の配置よりも標的の増幅においてより効率的であると考えられる。

以下の表に示されるこれらの結果は、RT / リバースプライマーの設計を調整すること、およびプライマーに異なる化学改変を含めることの性能効果を実証する。表中、各プライマー設計について得られた Ct 値の範囲は以下の通りであった：

10

20

30

40

50

o b a s (登録証用) 6 8 0 0 / 8 8 0 0 汎用 P C R M a s t e r M i x、および T a q M a n (登録商標) 増幅および検出技術を使用することが含まれる。結果は、DNA の高インプットレベルにおけるアンプリコン産生および蛍光シグナルを示し、ブロックオリゴヌクレオチドを含めると C t 値が遅延する。ブロックオリゴに含まれる化学改変塩基の数および配置に応じて C t 値に中程度の変動があり、いくつかの配置は、他よりも競合 (DNA 標的に対するプライマー結合の低下) においてより効率的であると考えられる。

以下の表に示されるこれらの結果は、競合的ブロックオリゴヌクレオチドの設計を調整すること、およびブロックオリゴに異なる化学改変を含めることの性能効果を実証する。表中、各マスターミックスについて得られた C t 値の範囲は以下の通りであった：

【表 1 0】

ブロッカー	配列	配列番号	1 E 6 コピー / r x n の H B V DNA
No blocker	N/A		B
HBVPA_BLOCK1	AACTCCACAGAAGCTCCAAATTC<SpC_C3>	1	C
HBVPA_BLOCK2	AGAGTAACTCCACAGAAGCTCCAAATTC<SpC_C3>	2	E
HBVPA_BLOCK3	GAGAGTAACTCCACAGAAGCTC<SpC_C3>	3	C
HBVPA_BLOCK5	GAGAGTAACTCCACAGAAGC<SpC_C3>	4	D
HBVPA_BLOCK5L	G<LNA-A>GAGT<LNA-A>AC<LNA-T>CCACA<LNA-G>AA<LNA-G>C<SpC_C3>	5	C

A は C t 2 5 B は C t 3 0 C は C t 3 2 D は C t 3 5 E は反応なし
 ~ 3 0 である ~ 3 2 である ~ 3 5 である 超である である

実施例 1 3 : DNA の増幅に対する競合的ブロックオリゴ改変の効果

【 0 1 5 0】

HBV RNA ポリ A 標的アッセイは、HBV pg RNA 標的を用いて、図 1 および図 2 に示すように R T プライマー (リバースプライマーとして使用される) を使用して設計した。このアッセイは、HBV DNA のオフターゲット増幅に対するアッセイの特異性を改善するために競合的ブロックオリゴヌクレオチドを利用する。ブロッカー設計プライマー設計を変化させた場合のアッセイの性能を、HBV DNA サンプルであるサンプルに対する P C R 蛍光シグナルによって確認した。

【 0 1 5 1】

反応はまた、 1×10^7 コピー / r x n の HBV DNA 鋳型上で行った。競合的ブロックオリゴヌクレオチドを含むアッセイを行った。この実験では、使用したリバースプライマーは実施例 1 2 のものとは異なっていた。この実験では、使用した R T / リバースプライマーは、フォワードプライマー (配列番号 3 8 7) およびプローブ (配列番号 3 8 8) と共に HBV__P A__2 5__3 5 1__ (配列番号 3 4) であった。ここで、使用したブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号 2、9、1 0、1 1 および 1 4 であった。

【 0 1 5 2】

アッセイ比較を L C 4 8 0 P C R 機器で行った。使用される試薬には、c o b a s (登録商標) 6 8 0 0 / 8 8 0 0 と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有する c o b a s (登録証用) 6 8 0 0 / 8 8 0 0 汎用 P C R M a s t e r M i x、および T a q M a n (登録商標) 増幅および検出技術を使用することが含まれる。結果は、DNA の高インプットレベルにおけるアンプリコン産生および蛍光シグナルを示し、ブロックオリゴヌクレオチドを含めると C t 値が遅延する。ブロックオリゴに含まれる化学改変塩基の数および配置に応じて C t 値に中程度の変動があり、いくつかの配置 (一般的により長いオリゴおよび / またはより改変塩基を有するオリゴ) は、他よりも競合 (DNA 標的に対するプライマー結合の低下) においてより効率的であると考えられる。

以下の表に示されるこれらの結果は、競合的ブロックオリゴヌクレオチドの設計を調整すること、およびブロックオリゴに異なる化学改変を含めることの性能効果を実証する。表中、各マスターミックスについて得られた C t 値の範囲は以下の通りであった：

10

20

30

40

50

【表 1 1】

ブロッカー	配列	配列番号	1E7コピー /rxnのHBV DNA
No blocker			A
HBVPA_BLOCK2	AGAGTAACTCCACAGAAGCTCCAAATTC<SpC3>	2	B
HBVPA_BLOCK2-1	AGAGTAACTCCACAGAAGCTCCAAATTC<SpC3>	9	C
HBVPA_BLOCK2-2	AGAGTAACTCCACAGAAGCTCCAAATTC<SpC3>	10	C
HBVPA_BLOCK25-1	GAGAGTAACTCCACAGAAGCTCCAAATTC<SpC3>	11	C
HBVPA_BLOCK7	CAGAAGGCAAAA<dI>GAGAGTAACTCCACAGAAGCTCCAAATTC<SpC3>	14	C

AはCt25 BはCt30 CはCt32 DはCt35 Eは反応なし
 ~30である ~32である ~35である 超である である

10

実施例 1 4 : DNAの増幅に対する競合的ブロックオリゴ改変の効果

【0153】

HBV RNAポリA標的アッセイは、HBV pgRNA標的を用いて、図1および図2に示すようにRTプライマー（リバースプライマーとして使用される）を使用して設計した。このアッセイは、HBV DNAのオフターゲット増幅に対するアッセイの特異性を改善するために競合的ブロックオリゴヌクレオチドを利用する。ブロッカー設計プライマー設計を変化させた場合のアッセイの性能を、HBV DNAサンプルであるサンプルに対するPCR蛍光シグナルによって確認した。

20

【0154】

反応は、12.5ng/rxnヒトDNAをバックグラウンドとして、2x10⁶IU/rxnのHBV DNA鋳型において行った。競合的ブロックオリゴヌクレオチドを含むアッセイを行った。この実験では、使用したRT/リバースプライマーは、フォワードプライマー（配列番号387）およびプローブ（配列番号388）と共にHBV_PA-V_5_LNA_25_351_MIX（配列番号151）であった。ここで、使用したブロックオリゴヌクレオチドは、配列番号2、10、11、および15であった。

30

【0155】

アッセイ比較をLC480 PCR機器で行った。使用される試薬には、cobas（登録商標）6800/8800と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有するcobas（登録証用）6800/8800汎用PCR Master Mix、およびTaqMan（登録商標）増幅および検出技術を使用することが含まれる。結果は、DNAの高インプットレベルにおけるアンプリコン産生および蛍光シグナルを示し、ブロックオリゴヌクレオチドを含めるとCt値が遅延する。ブロックオリゴに含まれる化学改変塩基の数および配置に応じて、Ct値には中程度の変動がある。

以下の表に示されるこれらの結果は、長さが異なる競合的ブロックオリゴヌクレオチドのいくつかの設計、および異なる化学改変を含めることを実証する。表中、各マスターミックスについて得られたCt値の範囲は以下の通りであった：

40

【表 1 2】

ブロッカー	配列	配列番号	2E8 IU/rxn HBV DNA in 12.5 ng hgDNA/rxn
HBVPA_BLOCK25-1	GAGAG<pdU>AA<5_Me_dC><pdU><5_Me_dC><5_Me_dC>A<5_Me_dC>AGAAG<5_Me_dC>T<5_Me_dC>CAAA<pdU>TC<Spc_C3>	11	C
HBVPA_BLOCK2	AGAGTAACTCCACAGAAGCTCCAAATTC<Spc_C3>	2	C
HBVPA_BLOCK2-2	AGAG<pdU>AAC<pdU><5_Me_dC>CA<5_Me_dC>AGAAG<5_Me_dC><pdU><5_Me_dC><5_Me_dC>AAA<pdU>TC<Spc_C3>	10	C
HBVPA_BLOCK5L9	G<LNA-A>G<LNA-A>G<LNA-T>A<LNA-A>C<LNA-T>C<LNA-C>A<LNA-C>A<LNA-G>AA<LNA-G>C<Spc_C3>	15	C
No blocker	N/A		B

A は Ct 25 ~ 30 である B は Ct 30 ~ 32 である B は Ct 32 ~ 35 である D は Ct 35 超である E は反応なしである

10

【 0 1 5 6 】

前述の発明を明確化および理解するためにある程度詳細に説明してきたが、本開示を読むことにより、形態および詳細の様々な変更を行うことができることが当技術分野の当業者には明らかであろう。例えば、上述した全ての技術および装置を、様々な組合せで使用することができる。

以上、本発明を要約すると下記のとおりである。

1. サンプル中の B 型肝炎ウイルス (HBV) RNA の 1 つまたは複数の標的核酸を検出する方法であって、

20

(a) サンプルを提供することと、

(b) HBV RNA の前記 1 つまたは複数の標的核酸がサンプル中に存在する場合、増幅産物を産生するために、サンプルを 1 つまたは複数の競合的結合オリゴヌクレオチドおよび 1 つまたは複数のプライマーセットおよび核酸ポリメラーゼと接触させることを含む増幅工程を実施することであって、前記 1 つまたは複数のプライマーセットは、1 つまたは複数のフォワードプライマーと、リバープライマーとしても機能する 1 つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーとを含む、増幅工程を実施すること、

(c) HBV RNA の前記 1 つまたは複数の標的核酸がサンプル中に存在する場合、前記増幅産物を 1 つまたは複数のプローブと接触させることを含む、ハイブリダイゼーション工程を実施すること、および

30

(d) 前記増幅産物の存在または非存在を検出することであって、前記増幅産物の存在は、前記サンプル中の HBV RNA の前記 1 つまたは複数の標的核酸の存在を示し、前記増幅産物の非存在は、前記サンプル中の HBV RNA の前記 1 つまたは複数の標的核酸の非存在を示す、検出することを含む、検出工程を実施することを含む方法。

2. 前記 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、前記サンプル中に存在し得る任意の相同 HBV DNA にハイブリダイズし、それにより、前記サンプル中に存在し得る任意の相同 HBV DNA への前記 1 つまたは複数のプライマーセットの結合を防止する、上記 1 に記載の方法。

40

3. HBV RNA の前記 1 つまたは複数の標的核酸が、共有結合的に閉じた環状二本鎖 DNA (cccDNA) に由来する、上記 1 または 2 に記載の方法。

4. 前記 cccDNA が HBV プレゲノム RNA (pgRNA) である、上記 3 に記載の方法。

5. HBV RNA の前記 1 つまたは複数の標的核酸がポリ A テールを含む、上記 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

6. リバープライマーとしても機能する前記 1 つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーが、HBV RNA の前記 1 つまたは複数の標的核酸の前記ポリ A テールに結合するためのポリ T 部分を含む、上記 5 に記載の方法。

7. 前記サンプルが生物学的サンプルである、上記 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

50

8. 前記生物学的サンプルが血漿である、上記7に記載の方法。

9. 前記生物学的サンプルが血液である、上記7に記載の方法。

10. (i) 前記1つまたは複数のフォワードプライマーが、配列番号387の核酸配列またはその相補体を含み、

(ii) リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号34、35、43、94、96、112、116、117、119、121、123、124、141、142、151、152、153、154、155、157、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、

10

(iii) 前記1つまたは複数のプローブが、配列番号388の核酸配列またはその相補体を含み、かつ

(iv) 前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号1、2、3、4、5、9、10、11、14および15から選択される群の核酸配列またはその相補体を含む、上記1から9のいずれかに記載の方法。

11. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが2つの核酸配列を含み、前記2つの核酸配列が配列番号151および152の核酸配列またはそれらの相補体を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む、上記10に記載の方法。

20

12. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号96の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む、上記10に記載の方法。

13. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが配列番号43の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号2の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む、上記10に記載の方法。

14. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号96、112、116、および117から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号2の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む、上記10に記載の方法。

30

15. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号94、96、116、117、119、121、123、124、151、153、155、および157から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む、上記10に記載の方法。

16. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号142、161、162、163、164、165、166、167、168、169、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む、上記10に記載の方法。

40

17. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号141、153、157、161、163、169、171、173、175、177、179、181、183、185、188、および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記1つまたは複数の競

50

合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号 11 の核酸配列またはその相補体を含む 1 つの配列を含む、上記 10 に記載の方法。

18. リバースプライマーとしても機能する前記 1 つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーが、配列番号 35 の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号 1、2、3、4、および 5 から選択される群の 1 つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む、上記 10 に記載の方法。

19. リバースプライマーとしても機能する前記 1 つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーが、配列番号 34 の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号 2、9、10、11、および 14 から選択される群の 1 つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む、上記 10 に記載の方法。

10

20. リバースプライマーとしても機能する前記 1 つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーが、配列番号 151 の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号 2、10、11、および 15 から選択される群の 1 つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む、上記 10 に記載の方法。

21. 前記ハイブリダイゼーション工程が、前記増幅産物を 1 つまたは複数の検出可能なプローブと接触させることを含み、前記 1 つまたは複数の検出可能なプローブが、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター部分によって標識されており、前記検出工程が、前記プローブの前記ドナー蛍光部分と前記アクセプター部分との間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の存在または非存在を検出することを含み、蛍光の存在または非存在が、前記サンプル中の HBV RNA の存在または非存在を示す、上記 1 から 20 のいずれかに記載の方法。

20

22. 前記ドナー蛍光部分および前記対応するアクセプター部分が、前記プローブ上で互いにわずか 8 ~ 20 ヌクレオチド以内にある、上記 21 に記載の方法。

23. 前記アクセプター部分がクエンチャーである、上記 21 または 22 に記載の方法。

24. 前記増幅工程が、5' から 3' ヌクレアーゼ活性を有する熱安定性核酸ポリメラーゼを用いる、上記 1 から 23 のいずれかに記載の方法。

25. 前記核酸ポリメラーゼが熱安定性であり、逆転写酵素 (RT) および DNA 増幅活性を示す、上記 1 から 24 のいずれかに記載の方法。

26. 2 つの熱安定性核酸ポリメラーゼが提供され、1 つの核酸ポリメラーゼが逆転写酵素 (RT) 活性を示し、1 つの核酸ポリメラーゼが DNA 増幅活性を示す、上記 1 から 24 のいずれかに記載の方法。

30

27. サンプル中に存在し得る B 型肝炎ウイルス (HBV) RNA の 1 つまたは複数の標的核酸を検出するためのキットであって、

(a) 核酸ポリメラーゼ、

(b) ヌクレオシド三リン酸、

(c) 1 つまたは複数のフォワードプライマーおよびリバースプライマーとしても機能する 1 つまたは複数の逆転写 (RT) プライマーを含む 1 つまたは複数のプライマーセット、

(d) 1 つまたは複数のプローブ、および

(e) 1 つまたは複数の競合的結合オリゴヌクレオチドを含む増幅試薬を含む、キット。

40

28. 前記 1 つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、前記サンプル中に存在し得る任意の相同 HBV DNA にハイブリダイズし、それにより、前記サンプル中に存在し得る任意の相同 HBV DNA への前記 1 つまたは複数のプライマーセットの結合を防止する、上記 27 に記載のキット。

29. HBV RNA の前記 1 つまたは複数の標的核酸が、共有結合的に閉じた環状二本鎖 DNA (cccDNA) に由来する、上記 27 または 28 に記載のキット。

30. 前記 cccDNA が HBV プレゲノム RNA (pgRNA) である、上記 29 に記載のキット。

31. HBV RNA の前記 1 つまたは複数の標的核酸がポリ A テールを含む、上記 27 から 30 のいずれかに記載のキット。

50

32. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、HBV RNAの前記1つまたは複数の標的核酸の前記ポリAテールに結合するためのポリT部分を含む、上記31に記載のキット。

33. 前記サンプルが生物学的サンプルである、上記27から32のいずれかに記載のキット。

34. 前記生物学的サンプルが血漿である、上記33に記載のキット。

35. 前記生物学的サンプルが、血液である、上記33に記載のキット。

36. (i) 前記1つまたは複数のフォワードプライマーが、配列番号387の核酸配列またはその相補体を含み、

(ii) リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号34、35、43、94、96、112、116、117、119、121、123、124、141、142、151、152、153、154、155、157、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、

(iii) 前記1つまたは複数のプローブが、配列番号388の核酸配列またはその相補体を含み、かつ

(iv) 前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号1、2、3、4、5、9、10、11、14、および15から選択される群の核酸配列またはその相補体を含む、上記27から35のいずれかに記載のキット。

37. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが2つの核酸配列を含み、前記2つの核酸配列が配列番号151および152の核酸配列またはそれらの相補体を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む、上記36に記載のキット。

38. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号96の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む、上記36に記載のキット。

39. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号43の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号2の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む、上記36に記載のキット。

40. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号96、112、116、および117から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号2の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む、上記36に記載のキット。

41. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号94、96、116、117、119、121、123、124、151、153、155、および157から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む、上記36に記載のキット。

42. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号142、161、162、163、164、165、166、167、168、169、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を

10

20

30

40

50

含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む、上記36に記載のキット。

43. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号141、153、157、161、163、169、171、173、175、177、179、181、183、185、188、および190から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号11の核酸配列またはその相補体を含む1つの配列を含む、上記36に記載のキット。

44. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号35の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号1、2、3、4および5から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む、上記36に記載のキット。

10

45. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号34の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号2、9、10、11および14から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む、上記36に記載のキット。

46. リバースプライマーとしても機能する前記1つまたは複数の逆転写(RT)プライマーが、配列番号151の核酸配列またはその相補体を含み、かつ前記1つまたは複数の競合的ブロックオリゴヌクレオチドが、配列番号2、10、11および15から選択される群の1つまたは複数の核酸配列またはその相補体を含む、上記36に記載のキット。

20

47. 前記1つまたは複数のプローブが、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター部分を含み、検出可能に標識されている、上記27から46のいずれかに記載のキット。

48. 前記ドナー蛍光部分および前記対応するアクセプター部分が、プローブ上で互いにわずか8~20ヌクレオチド以内にある、上記47に記載のキット。

49. 前記アクセプター部分がクエンチャーである、上記47または48のいずれかに記載のキット。

50. 核酸ポリメラーゼが、5'から3'ヌクレアーゼ活性を有する熱安定性ポリメラーゼ酵素である、上記27から49のいずれかに記載のキット。

51. 前記核酸ポリメラーゼが熱安定性であり、逆転写酵素(RT)およびDNA増幅活性を示す、上記27から50のいずれかに記載のキット。

30

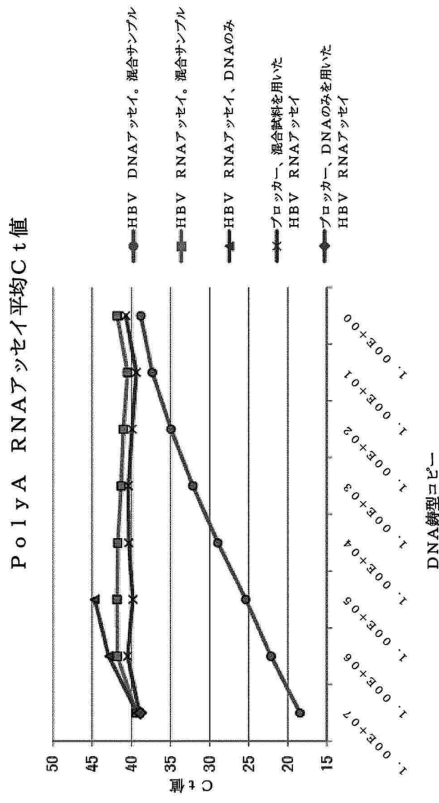
52. 2つの熱安定性核酸ポリメラーゼが提供され、1つの核酸ポリメラーゼが逆転写酵素(RT)活性を示し、1つの核酸ポリメラーゼがDNA増幅活性を示す、上記27から50のいずれかに記載のキット。

40

50

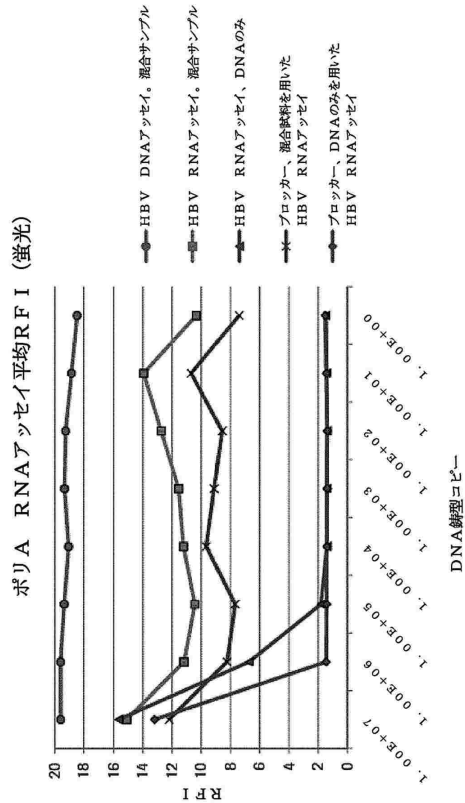
【図 5】

図 5



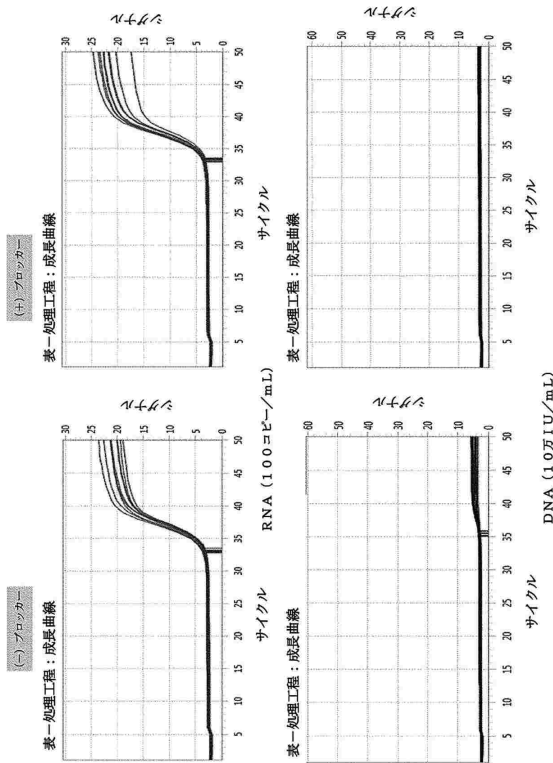
【図 6】

図 6



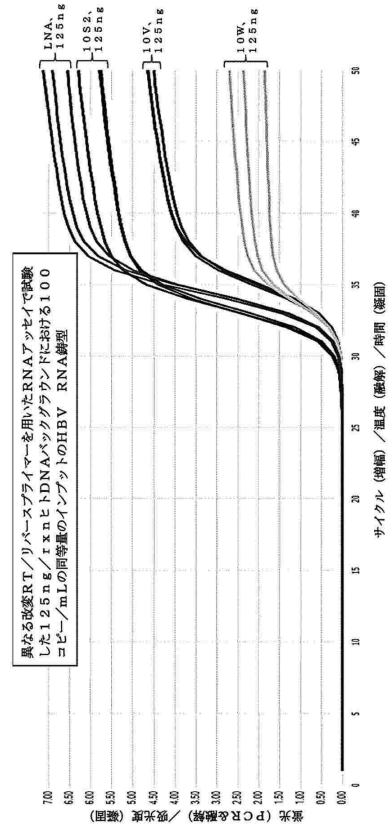
【図 7】

図 7



【図 8】

図 8



10

20

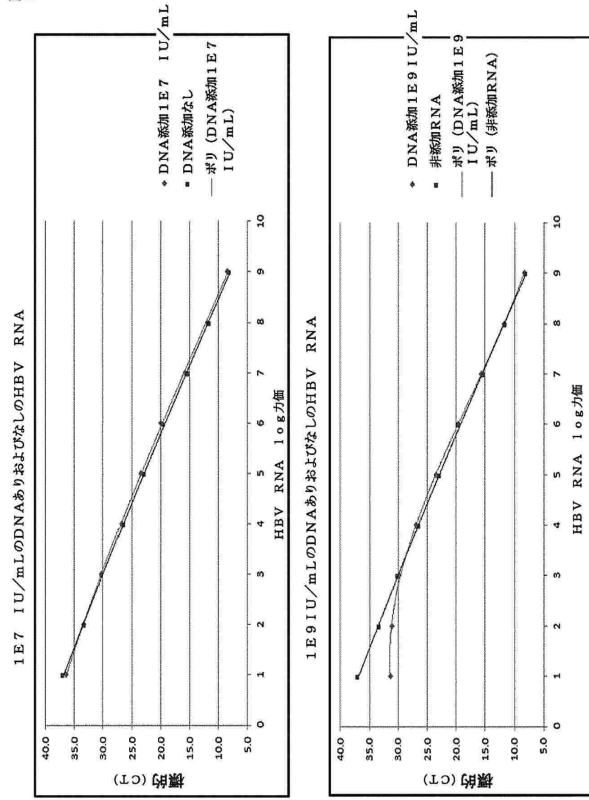
30

40

50

【 図 9 】

図 9



【 配列表 】

0007677950000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100138210
弁理士 池田 達則
- (74)代理人 100170852
弁理士 白樫 依子
- (72)発明者 ジェフリー フォン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300,
シー/オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド
- (72)発明者 アーロン サディアス ハミルトン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300,
シー/オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド
- (72)発明者 マリンサ ヘイル
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300,
シー/オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド
- (72)発明者 イゴル コズロフ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300,
シー/オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド
- (72)発明者 エド グスタボ マリンス
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300,
シー/オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド
- (72)発明者 エリザベス マリー スコット
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300,
シー/オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド
- (72)発明者 リン ワン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300,
シー/オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド
- 審査官 小倉 梢
- (56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0220969 (US, A1)
特表2015-530113 (JP, A)
韓国公開特許第10-2011-0140066 (KR, A)
特表2017-501683 (JP, A)
Arch. Virol., 2019年08月19日, Vol. 164, p. 2683-2690
J. Hepatol., 2018年, Vol. 68, p. S489, FRI-287
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12Q 1/00 - 1/70
C12N 15/09 - 15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)