

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-515192

(P2022-515192A)

(43)公表日 令和4年2月17日(2022.2.17)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/113(2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z 4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/6844(2018.01)	C 1 2 Q 1/6844	Z 4 B 0 5 0
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	Z 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/6876(2018.01)	C 1 2 Q 1/6876	Z Z N A
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全62頁)

(21)出願番号	特願2021-536015(P2021-536015)	(71)出願人	517119545 アルヴェオ テクノロジーズ インコーポ レイテッド AL VEO T E C H N O L O G I E S I N C . アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 0 1 アラメダ,アトランティック ア ヴェニュー 1 0 0 0 スイート 1 1 4
(86)(22)出願日	令和1年12月18日(2019.12.18)	(74)代理人	100077012 弁理士 岩谷 龍
(85)翻訳文提出日	令和3年8月20日(2021.8.20)	(72)発明者	ゲイテリ, ジョセフ カール アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 0 1 アラメダ,アトランティック ア ヴェニュー 1 0 0 0 スイート 1 1 4 アルヴェオ テクノロジーズ インコーポ レイテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2019/067134		
(87)国際公開番号	WO2020/132042		
(87)国際公開日	令和2年6月25日(2020.6.25)		
(31)優先権主張番号	62/782,610		
(32)優先日	平成30年12月20日(2018.12.20)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 等温増幅反応における非特異的増幅を低減するための方法および組成物

(57)【要約】

本発明の実施形態は、等温増幅反応における非特異的増幅を低減するための方法、システムおよび組成物に関する。いくつかの実施形態は、特定のオリゴヌクレオチドを使用して、ループ媒介等温増幅(LAMP)反応における非特異的増幅を低減することに関する。

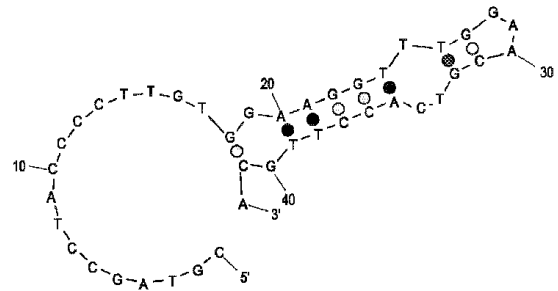


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的核酸のループ媒介等温増幅 (LAMP) 反応を行うのに十分な LAMP プライマーセットと;

ポリメラーゼと;

ヘアピンを含む第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドと

を含む水溶液であって、

第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドが、前記標的核酸に特異的にハイブリダイズせず、かつ該第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドの非存在下で LAMP 反応を行った場合と比べて、LAMP 反応の非特異的増幅産物の量を低減させる活性を有する、
水溶液。

10

【請求項 2】

第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドが、その 3' 末端に、ポリメラーゼによる該第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドの伸長を阻害するブロック部分を含む、請求項 1 に記載の水溶液。

【請求項 3】

前記ブロック部分が、リン酸塩、C3 スペース、アミン、ビオチンまたは逆位 (inverted) 塩基から選択される、請求項 2 に記載の水溶液。

【請求項 4】

第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドの 3' 末端がリン酸化されている、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の水溶液。

20

【請求項 5】

第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドが、ウラシルまたはイノシンを含むヌクレオチドを含んでいない、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の水溶液。

【請求項 6】

前記ヘアピンの T_m が約 65 未満である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の水溶液。

【請求項 7】

前記ヘアピンの T_m が約 55 未満である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の水溶液。

【請求項 8】

第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドの 3' 末端ヌクレオチドが一本鎖であり、該 3' 末端ヌクレオチドに続くヌクレオチドが二本鎖である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の水溶液。

30

【請求項 9】

前記ヘアピンが、連続する 3 個のヌクレオチドからなる一本鎖を含むループ、または連続する 3 個のヌクレオチドからなる一本鎖からなるループを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の水溶液。

【請求項 10】

第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドが、
配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸;

配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸; または

配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸

を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の水溶液。

40

【請求項 11】

第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドが、

配列番号 9 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸;

配列番号 9 のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸; または

50

配列番号 9 のヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の水溶液。

【請求項 12】

第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドが、配列番号 1 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；配列番号 1 のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号 1 のヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の水溶液。 10

【請求項 13】

第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドが、配列番号 2 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；配列番号 2 のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号 2 のヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の水溶液。

【請求項 14】

LAMP 試薬ミックスが、第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の水溶液。 20

【請求項 15】

第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドが、その 3' 末端に、ポリメラーゼによる該第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドの伸長を阻害するブロック部分を含む、請求項 14 に記載の水溶液。

【請求項 16】

第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドの 3' 末端がリン酸化されている、請求項 14 または 15 に記載の水溶液。

【請求項 17】

第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドの 3' 末端ヌクレオチドが一本鎖であり、該 3' 末端ヌクレオチドに続くヌクレオチドが二本鎖である、請求項 14 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の水溶液。 30

【請求項 18】

前記水溶液中における第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドと第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドの比率が、1 : 10 ~ 1 : 1 の範囲である、請求項 14 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の水溶液。

【請求項 19】

前記比率が約 1 : 5 または 1 : 5 である、請求項 18 に記載の水溶液。

【請求項 20】

第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドが、配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる、請求項 14 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の水溶液。 40

【請求項 21】

第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドが、
配列番号 9 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；
配列番号 9 のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる
核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または
配列番号 9 のヌクレオチド配列を有する核酸
を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれか
からなる、請求項 14 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の水溶液。

【請求項 22】

クラウディング剤をさらに含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の水溶液。

【請求項 23】

前記クラウディング剤が、ポリエチレングリコール (PEG)、デキストラン、ポリビニル
アルコール、ポリビニルピロリドンおよびフィコールから選択される、請求項 22 に記
載の水溶液。

【請求項 24】

前記クラウディング剤が、分子量 35000 の PEG、分子量 8000 の PEG および分子量 400
000 のフィコールから選択される、請求項 23 に記載の水溶液。

【請求項 25】

前記クラウディング剤が、分子量 35000 の PEG を含む、請求項 24 に記載の水溶液。

【請求項 26】

前記ポリメラーゼが、鎖置換活性を含む、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の水溶液

10

20

【請求項 27】

前記ポリメラーゼが、Bst ラージフラグメント、Bca (exo -) ポリメラーゼ、Vent ポリ
メラーゼ、Vent (exo -) ポリメラーゼ、Deep Vent ポリメラーゼ、Deep Vent (ex
o -) ポリメラーゼ、phi29 ファージポリメラーゼ、MS-2 ファージポリメラーゼ、Taq
ポリメラーゼ、Z-Taq ポリメラーゼ、KOD ポリメラーゼ、クレノウ断片、Bst2.0 ポリメ
ラーゼ、Bst3.0 ポリメラーゼ、Bst 誘導体、Bsu ポリメラーゼ、Gsp ポリメラーゼ、Sau
ポリメラーゼおよびこれらの任意の組み合わせから選択される、請求項 1 ~ 26 のいずれ
か 1 項に記載の水溶液。

【請求項 28】

前記ポリメラーゼが、Bst ラージフラグメントを含む、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に
記載の水溶液。

【請求項 29】

第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドの濃度が、 $0.1 \mu\text{M} \sim 20 \mu\text{M}$ または約 $0.1 \mu\text{M} \sim 約 20$
 μM の範囲である、請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の水溶液。

【請求項 30】

複数の異なる LAMP プライマーセットをさらに含み、各 LAMP プライマーセットが、それ
ぞれ別の標的核酸の LAMP 反応を行うのに十分である、請求項 1 ~ 29 のいずれか 1 項に
記載の水溶液。

【請求項 31】

前記 LAMP プライマーセットのプライマーが、配列番号 19 ~ 162 のいずれかから選択さ
れるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の水溶液。

【請求項 32】

前記 LAMP プライマーセットが、FIP プライマーと BIP プライマーを含み、これらのプ
ライマーのそれぞれが、配列番号 19 ~ 162 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を
有する、請求項 1 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の水溶液。

【請求項 33】

前記 LAMP プライマーセットが、F3 プライマー、B3 プライマー、FIP プライマー、BIP
プライマー、LF プライマーおよび LB プライマーを含み、これらのプライマーのそれぞれ
が、配列番号 19 ~ 162 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する、請求項 1

30

40

50

～ 3 2 のいずれか 1 項に記載の水溶液。

【請求項 3 4】

前記標的核酸が、デング熱ウイルス、A型インフルエンザウイルスH3N1株、A型インフルエンザウイルスH3N2株、インフルエンザ菌、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス1型、プラスモジウム属、バクテリオファージMS2、パルボウイルスB19、RSウイルス、サルモネラ・ティフィムリウムLT2株、ヒト型結核菌およびジカウイルスから選択されるウイルスまたは生物に由来する核酸である、請求項1～33のいずれか1項に記載の水溶液。

【請求項 3 5】

第1の阻害性オリゴヌクレオチドが、該第1の阻害性オリゴヌクレオチドの非存在下で行ったLAMP反応と比べて、LAMP反応における偽陽性の増幅の臨界時間値(Ct)を増加させる活性を有する、請求項1～34のいずれか1項に記載の水溶液。 10

【請求項 3 6】

前記増加が少なくとも2倍である、請求項35に記載の水溶液。

【請求項 3 7】

前記増加が少なくとも3倍である、請求項35または36に記載の水溶液。

【請求項 3 8】

前記増加が少なくとも10分である、請求項35に記載の水溶液。

【請求項 3 9】

前記増加が少なくとも15分である、請求項35または38に記載の水溶液。 20

【請求項 4 0】

標的核酸のループ媒介等温増幅(LAMP)反応において非特異的増幅を低減する方法であって、

請求項1～39のいずれか1項に記載の水溶液を含むLAMP試薬ミックスを提供する工程；および

標的核酸の存在下において前記LAMP試薬ミックスを用いたLAMP反応を行う工程を含み、

第1の阻害性オリゴヌクレオチドの非存在下でLAMP反応を行った場合と比べて、LAMP反応の非特異的増幅産物の量が低減する、方法。 30

【請求項 4 1】

前記LAMP反応における偽陽性の増幅の臨界時間値(Ct)が、第1の阻害性オリゴヌクレオチドの非存在下で行ったLAMP反応と比べて増加する、請求項40に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記Ct値の増加が少なくとも2倍である、請求項40に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記Ct値の増加が少なくとも3倍である、請求項41または42に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記Ct値の増加が10分である、請求項40に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記Ct値の増加が15分である、請求項40または44に記載の方法。 40

【請求項 4 6】

前記LAMP反応の増幅産物が、光信号、pH信号および電気信号から選択される信号の変化により検出される、請求項40～45のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記LAMP反応の増幅産物が、電気信号の変化により検出される、請求項40～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 4 8】

ヘアピンを含む単離された阻害性オリゴヌクレオチドであって、該阻害性オリゴヌクレオチドの非存在下でLAMP反応を行った場合と比べて、LAMP反応の非特異的増幅産物の量 50

を低減させる活性を有する、単離された阻害性オリゴヌクレオチド。

【請求項 49】

その 3' 末端に、ポリメラーゼによる第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドの伸長を阻害するブロック部分を含む、請求項 48 に記載の単離された阻害性オリゴヌクレオチド。

【請求項 50】

前記ブロック部分が、リン酸塩、C3 スペース、アミン、ビオチンまたは逆位 (inverted) 塩基から選択される、請求項 49 に記載の単離された阻害性オリゴヌクレオチド。

【請求項 51】

その 3' 末端がリン酸化されている、請求項 48 ~ 50 のいずれか 1 項に記載の単離された阻害性オリゴヌクレオチド。

10

【請求項 52】

ウラシルまたはイノシンを含むヌクレオチドを含んでいない、請求項 48 ~ 51 のいずれか 1 項に記載の単離された阻害性オリゴヌクレオチド。

【請求項 53】

前記ヘアピンの T_m が約 65 未満である、請求項 48 ~ 52 のいずれか 1 項に記載の単離された阻害性オリゴヌクレオチド。

【請求項 54】

前記ヘアピンの T_m が約 55 未満である、請求項 48 ~ 53 のいずれか 1 項に記載の単離された阻害性オリゴヌクレオチド。

【請求項 55】

前記阻害性オリゴヌクレオチドの 3' 末端ヌクレオチドが一本鎖であり、該 3' 末端ヌクレオチドに続くヌクレオチドが二本鎖である、請求項 48 ~ 54 のいずれか 1 項に記載の単離された阻害性オリゴヌクレオチド。

20

【請求項 56】

前記ヘアピンが、連続する 3 個のヌクレオチドからなる一本鎖を含むループ、または連続する 3 個のヌクレオチドからなる一本鎖からなるループを含む、請求項 48 ~ 55 のいずれか 1 項に記載の単離された阻害性オリゴヌクレオチド。

【請求項 57】

配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；

30

配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または

配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸

を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる、請求項 48 ~ 56 のいずれか 1 項に記載の単離された阻害性オリゴヌクレオチド。

【請求項 58】

配列番号 9 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；

配列番号 9 のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または

40

配列番号 9 のヌクレオチド配列を有する核酸

を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる、請求項 48 ~ 57 のいずれか 1 項に記載の単離された阻害性オリゴヌクレオチド。

【請求項 59】

配列番号 1 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；

配列番号 1 のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または

配列番号 1 のヌクレオチド配列を有する核酸

50

を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる、請求項 48 ~ 58 のいずれか 1 項に記載の単離された阻害性オリゴヌクレオチド。

【請求項 60】

配列番号 2 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；
配列番号 2 のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または
配列番号 2 のヌクレオチド配列を有する核酸
を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる、請求項 48 ~ 59 のいずれか 1 項に記載の単離された阻害性オリゴヌクレオチド。

10

【請求項 61】

請求項 48 ~ 60 のいずれか 1 項に記載の阻害性オリゴヌクレオチドを含む第 1 の阻害性オリゴヌクレオチド；ならびに
鎖置換活性を含むポリメラーゼおよび標的核酸のループ媒介等温増幅 (LAMP) 反応を行うのに十分な LAMP プライマーセットから選択される試薬
を含むキット。

【請求項 62】

第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項 61 に記載のキット。

【請求項 63】

第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドが、その 3' 末端に、ポリメラーゼによる該第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドの伸長を阻害するブロック部分を含む、請求項 62 に記載のキット。

20

【請求項 64】

第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドの 3' 末端がリン酸化されている、請求項 63 に記載のキット。

【請求項 65】

第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドの 3' 末端ヌクレオチドが一本鎖であり、該 3' 末端ヌクレオチドに続くヌクレオチドが二本鎖である、請求項 62 ~ 64 のいずれか 1 項に記載のキット。

30

【請求項 66】

前記水溶液中における第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドと第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドの比率が、1 : 10 ~ 1 : 1 の範囲である、請求項 62 ~ 65 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 67】

前記比率が約 1 : 5 または 1 : 5 である、請求項 66 に記載のキット。

【請求項 68】

第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドが、
配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；
配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または
配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸
を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる、請求項 62 ~ 67 のいずれか 1 項に記載のキット。

40

【請求項 69】

第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドが、
配列番号 9 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；
配列番号 9 のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる

50

核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号 9 のヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる、請求項 6 2 ~ 6 8 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 7 0】

複数の異なる LAMP プライマーセットをさらに含み、各 LAMP プライマーセットが、それぞれ別の標的核酸の LAMP 反応を行うのに十分である、請求項 6 1 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 7 1】

前記 LAMP プライマーセットが、少なくとも 4 種のプライマーを含む、請求項 6 1 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載のキット。 10

【請求項 7 2】

前記 LAMP プライマーセットが、少なくとも 6 種のプライマーを含む、請求項 6 1 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 7 3】

前記 LAMP プライマーセットのプライマーが、配列番号 19 ~ 162 のいずれかで示される核酸配列を含む、請求項 6 1 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 7 4】

前記 LAMP プライマーセットが、F3 プライマー、B3 プライマー、FIP プライマー、BIP プライマー、LF プライマーおよび LB プライマーを含み、これらのプライマーのそれぞれが、配列番号 19 ~ 162 のいずれかで示される核酸配列を有する、請求項 6 1 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載のキット。 20

【請求項 7 5】

前記標的核酸が、デング熱ウイルス、A 型インフルエンザウイルス H3N1 株、A 型インフルエンザウイルス H3N2 株、インフルエンザ菌、A 型肝炎ウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス 1 型、プラスモジウム属、バクテリオファージ MS2、パルボウイルス B19、RS ウイルス、サルモネラ・ティフィムリウム LT2 株、ヒト型結核菌およびジカウイルスから選択されるウイルスまたは生物に由来する核酸である、請求項 6 1 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 7 6】

前記ポリメラーゼが、Bst ラージフラグメント、Bca (exo -) ポリメラーゼ、Vent ポリメラーゼ、Vent (exo -) ポリメラーゼ、Deep Vent ポリメラーゼ、Deep Vent (exo -) ポリメラーゼ、phi29 ファージポリメラーゼ、MS-2 ファージポリメラーゼ、Taq ポリメラーゼ、Z-Taq ポリメラーゼ、KOD ポリメラーゼ、クレノウ断片、Bst2.0 ポリメラーゼ (NEB 社)、Bst3.0 ポリメラーゼ (NEB 社)、Bst 誘導體、Bsu ポリメラーゼ、Gsp ポリメラーゼ、Sau ポリメラーゼおよびこれらの任意の組み合わせから選択される、請求項 6 1 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載のキット。 30

【請求項 7 7】

前記ポリメラーゼが、Bst ラージフラグメントを含む、請求項 6 1 ~ 7 6 のいずれか 1 項に記載のキット。 40

【請求項 7 8】

試薬ミックスがクラウディング剤を含む、請求項 6 1 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 7 9】

前記クラウディング剤が、ポリエチレングリコール (PEG)、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンおよびフィコールから選択される、請求項 7 8 に記載のキット。

【請求項 8 0】

前記クラウディング剤が、分子量 35000 の PEG、分子量 8000 の PEG および分子量 40000 のフィコールから選択される、請求項 7 9 に記載のキット。 50

【請求項 8 1】

前記クラウディング剤が、分子量35000のPEGを含む、請求項 8 0 に記載のキット。

【請求項 8 2】

ループ媒介等温増幅（LAMP）反応における標的核酸の検出用システムであって、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の水溶液を含む容器；および前記容器内の増幅産物を検出するように構成された検出器を含むシステム。

【請求項 8 3】

標的核酸をさらに含む、請求項 8 2 に記載のシステム。

【請求項 8 4】

前記検出器が、電気信号または光信号の変化を検出するように構成されている、請求項 8 2 または 8 3 に記載のシステム。

【請求項 8 5】

前記検出器が、電気信号の変化を検出するように構成されている、請求項 8 2 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2018年12月20日に出願された「等温増幅反応における非特異的増幅を低減するための方法および組成物」という名称の米国仮特許出願第62/782,610号の優先権を主張するものであり、この出願は引用によりその全体が本明細書に明示的に援用される。

【0002】

配列表の参照

本願は電子形式の配列表とともに出願されたものである。この配列表は、ALVEO016W OSEQLISTINGのファイル名で2019年12月7日に作成された約31kbのファイルとして提供されたものである。この電子形式の配列表に記載の情報は、引用によりその全体が本明細書に援用される。

【0003】

本発明の実施形態は、非特異的増幅を低減するための、またはそれ以外の方法で等温増幅反応を改善するための方法、システムおよび組成物に関する。いくつかの実施形態は、特定のオリゴヌクレオチドを使用して、ループ媒介等温増幅（LAMP）反応における非特異的増幅を低減することに関する。

【背景技術】

【0004】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、1983年に開発されて以来、核酸増幅において中心的な役割を果たしてきた。しかしながら、PCRアッセイには、温度に依存した複数の段階においてDNA断片を増幅するために高価なサーマルサイクラーが必要とされる。

【0005】

ループ媒介等温増幅（LAMP）アッセイは、別の核酸増幅技術である。PCRとは対照的に、LAMPアッセイは、一定の温度で標的配列を増幅することができる。したがって、LAMPアッセイには、大型で高価なサーマルサイクラーは必要とされない。LAMPアッセイは、強力な鎖置換活性を有する単一のDNAポリメラーゼと、DNAまたはRNAである核酸標的の迅速な等温増幅（通常60~70℃）を促す4~6種類の特別に設計されたプライマーセットとを使用する。陽性の結果は、蛍光DNA結合色素の添加または濁度により視覚的に同定することができる。一方で、LAMPアッセイは、偽陽性の結果が示される傾向が高い。例えば、Senarath, K.D., et al., Journal of Tuberculosis Research, 2014, 2, 168-172; Nagai K., et al., Sci. Rep. 6, 39090; doi: 10.1038/srep39090 2016; およびSuleman E., et al., J Vet Diagn Invest. 2016 Sep;28

10

20

30

40

50

(5):536-42を参照されたい。したがって、より堅牢なLAMPアッセイが必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、標的核酸のループ媒介等温増幅(LAMP)反応を行うのに十分なLAMPプライマーセットと;

ポリメラーゼと;

ヘアピンを含む第1の阻害性オリゴヌクレオチドと

を含む水溶液であって、

第1の阻害性オリゴヌクレオチドが、前記標的核酸に特異的にハイブリダイズせず、かつ該第1の阻害性オリゴヌクレオチドの非存在下でLAMP反応を行った場合と比べて、LAMP反応の非特異的増幅産物の量を低減させる活性を有する、

水溶液を含む。

【0007】

いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドは、その3'末端に、ポリメラーゼによる該第1の阻害性オリゴヌクレオチドの伸長を阻害するブロック部分を含む。いくつかの実施形態において、前記ブロック部分は、リン酸塩、C3スペーサー、アミン、ピオチンまたは逆位(inverted)塩基から選択される。いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドは、その3'末端がリン酸化されている。

【0008】

いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドは、ウラシルまたはイノシンを含むヌクレオチドを含んでいない。

【0009】

いくつかの実施形態において、前記ヘアピンの T_m は、約65 未満である。いくつかの実施形態において、前記ヘアピンの T_m は、約55 未満である。

【0010】

いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドは一本鎖であり、該3'末端ヌクレオチドに続くヌクレオチドは二本鎖である。

【0011】

いくつかの実施形態において、前記ヘアピンは、連続する3個のヌクレオチドからなる一本鎖を含むループ、または連続する3個のヌクレオチドからなる一本鎖からなるループを含む。

【0012】

いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~15のいずれかから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸;

配列番号1~15のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸;または

配列番号1~15のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。

【0013】

いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドは、

配列番号9のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸;

配列番号9のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸;または

配列番号9のヌクレオチド配列を有する核酸

10

20

30

40

50

を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。

【0014】

いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸；配列番号1のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号1のヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。

10

【0015】

いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号2のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸；配列番号2のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号2のヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。

【0016】

いくつかの実施形態において、LAMP試薬ミックスは、第2の阻害性オリゴヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態において、第2の阻害性オリゴヌクレオチドは、その3'末端に、ポリメラーゼによる該第2の阻害性オリゴヌクレオチドの伸長を阻害するブロック部分を含む。いくつかの実施形態において、第2の阻害性オリゴヌクレオチドは、その3'末端がリン酸化されている。

20

【0017】

いくつかの実施形態において、第2の阻害性オリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドは一本鎖であり、該3'末端ヌクレオチドに続くヌクレオチドは二本鎖である。

【0018】

いくつかの実施形態において、前記水溶液中における第1の阻害性オリゴヌクレオチドと第2の阻害性オリゴヌクレオチドの比率は、1:10~1:1の範囲である。いくつかの実施形態において、前記比率は約1:5または1:5である。

30

【0019】

いくつかの実施形態において、第2の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~15のいずれかから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸；配列番号1~15のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号1~15のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。

40

【0020】

いくつかの実施形態において、第2の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号9のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸；配列番号9のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号9のヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。

【0021】

50

いくつかの実施形態は、クラウディング剤をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記クラウディング剤は、ポリエチレングリコール（PEG）、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンおよびフィコールから選択される。いくつかの実施形態において、前記クラウディング剤は、分子量35000のPEG、分子量8000のPEGおよび分子量400000のフィコールから選択される。いくつかの実施形態において、前記クラウディング剤は、分子量35000のPEGを含む。

【0022】

いくつかの実施形態において、前記ポリメラーゼは鎖置換活性を含む。いくつかの実施形態において、前記ポリメラーゼは、Bstラージフラグメント、Bca(exo-)ポリメラーゼ、Ventポリメラーゼ、Vent(exo-)ポリメラーゼ、Deep Ventポリメラーゼ、Deep Vent(exo-)ポリメラーゼ、phi29ファージポリメラーゼ、MS-2ファージポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Z-Taqポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、クレノウ断片、Bst2.0ポリメラーゼ、Bst3.0ポリメラーゼ、Bst誘導体、Bsuポリメラーゼ、Gspポリメラーゼ、Sauポリメラーゼおよびこれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの実施形態において、前記ポリメラーゼは、Bstラージフラグメントを含む。

10

【0023】

いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドの濃度は、0.1 μM ~ 20 μMまたは約0.1 μM ~ 約20 μMの範囲である。

【0024】

いくつかの実施形態は、複数の異なるLAMPプライマーセットをさらに含み、各LAMPプライマーセットは、それぞれ別の標的核酸のLAMP反応を行うのに十分である。いくつかの実施形態において、前記LAMPプライマーセットのプライマーは、配列番号19~162のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記LAMPプライマーセットは、FIPプライマーとBIPプライマーを含み、これらのプライマーのそれぞれが、配列番号19~162のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態において、前記LAMPプライマーセットは、F3プライマー、B3プライマー、FIPプライマー、BIPプライマー、LFプライマーおよびLBプライマーを含み、これらのプライマーのそれぞれが、配列番号19~162のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する。

20

【0025】

いくつかの実施形態において、前記標的核酸は、デング熱ウイルス、A型インフルエンザウイルスH3N1株、A型インフルエンザウイルスH3N2株、インフルエンザ菌、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス1型、プラスモジウム属、バクテリオファージMS2、パルボウイルスB19、RSウイルス、サルモネラ・ティフィムリウムLT2株、ヒト型結核菌およびジカウイルスから選択されるウイルスまたは生物に由来する核酸である。

30

【0026】

いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドは、該第1の阻害性オリゴヌクレオチドの非存在下で行ったLAMP反応と比べて、LAMP反応における偽陽性の増幅の臨界時間値(Ct)を増加させる活性を有する。いくつかの実施形態において、前記増加は、少なくとも2倍である。いくつかの実施形態において、前記増加は、少なくとも3倍である。いくつかの実施形態において、前記増加は、少なくとも10分である。いくつかの実施形態において、前記増加は、少なくとも15分である。

40

【0027】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、標的核酸のループ媒介等温増幅(LAMP)反応において非特異的増幅を低減する方法であって、前記水溶液のうちのいずれかである水溶液を含むLAMP試薬ミックスを提供する工程；および標的核酸の存在下において前記LAMP試薬ミックスを用いたLAMP反応を行う工程を含み、

50

第1の阻害性オリゴヌクレオチドの非存在下でLAMP反応を行った場合と比べて、LAMP反応の非特異的増幅産物の量が低減する、方法を含む。

【0028】

いくつかの実施形態において、前記LAMP反応における偽陽性の増幅の臨界時間値(Ct)は、第1の阻害性オリゴヌクレオチドの非存在下で行ったLAMP反応と比べて増加する。いくつかの実施形態において、前記Ct値の増加は、少なくとも2倍である。いくつかの実施形態において、前記Ct値の増加は、少なくとも3倍である。いくつかの実施形態において、前記Ct値の増加は、10分である。いくつかの実施形態において、前記Ct値の増加は、15分である。

10

【0029】

いくつかの実施形態において、前記LAMP反応の増幅産物は、光信号、pH信号および電気信号から選択される信号の変化により検出される。いくつかの実施形態において、前記LAMP反応の増幅産物は、電気信号の変化により検出される。

【0030】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、ヘアピンを含む単離された阻害性オリゴヌクレオチドであって、該阻害性オリゴヌクレオチドの非存在下でLAMP反応を行った場合と比べて、LAMP反応の非特異的増幅産物の量を低減させる活性を有することを特徴とする、単離された阻害性オリゴヌクレオチドを含む。

【0031】

いくつかの実施形態において、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、その3'末端に、ポリメラーゼによる該第1の阻害性オリゴヌクレオチドの伸長を阻害するブロック部分を含む。いくつかの実施形態において、前記ブロック部分は、リン酸塩、C3スパーサー、アミン、ピオチンまたは逆位(inverted)塩基から選択される。いくつかの実施形態において、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、その3'末端がリン酸化されている。

20

【0032】

いくつかの実施形態において、第1のオリゴヌクレオチドは、ウラシルまたはイノシンを含むヌクレオチドを含んでいない。

【0033】

いくつかの実施形態において、前記ヘアピンのT_mは、約65 未満である。いくつかの実施形態において、前記ヘアピンのT_mは、約55 未満である。

30

【0034】

いくつかの実施形態において、前記阻害性オリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドは一本鎖であり、該3'末端ヌクレオチドに続くヌクレオチドは二本鎖である。いくつかの実施形態において、前記ヘアピンは、連続する3個のヌクレオチドからなる一本鎖を含むループ、または連続する3個のヌクレオチドからなる一本鎖からなるループを含む。

【0035】

いくつかの実施形態において、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~15のいずれかから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸；

40

配列番号1~15のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または

配列番号1~15のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。

【0036】

いくつかの実施形態において、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、

配列番号9のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸；

配列番号9のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる

50

核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号 9 のヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。

【0037】

いくつかの実施形態において、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；配列番号 1 のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号 1 のヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。

10

【0038】

いくつかの実施形態において、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号 2 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；配列番号 2 のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号 2 のヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。

20

【0039】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、前記阻害性オリゴヌクレオチドのいずれかである阻害性オリゴヌクレオチドを含む第 1 の阻害性オリゴヌクレオチド；ならびに鎖置換活性を含むポリメラーゼおよび標的核酸のループ媒介等温増幅 (LAMP) 反応を行うのに十分な LAMP プライマーセットから選択される試薬を含むキットを含む。

【0040】

いくつかの実施形態は、第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態において、第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドは、その 3' 末端に、ポリメラーゼによる該第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドの伸長を阻害するブロック部分を含む。いくつかの実施形態において、第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドは、その 3' 末端がリン酸化されている。いくつかの実施形態において、第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドの 3' 末端ヌクレオチドは一本鎖であり、該 3' 末端ヌクレオチドに続くヌクレオチドは二本鎖である。

30

【0041】

いくつかの実施形態において、前記水溶液中における第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドと第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドの比率は、1 : 10 ~ 1 : 1 の範囲である。いくつかの実施形態において、前記比率は約 1 : 5 または 1 : 5 である。

【0042】

いくつかの実施形態において、第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。

40

【0043】

いくつかの実施形態において、第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドは、

50

配列番号9のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸；
配列番号9のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または
配列番号9のヌクレオチド配列を有する核酸
を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。

【0044】

いくつかの実施形態は、複数の異なるLAMPプライマーセットをさらに含み、各LAMPプライマーセットは、それぞれ別の標的核酸のLAMP反応を行うのに十分である。いくつかの実施形態において、前記LAMPプライマーセットは、少なくとも4種のプライマーを含む。いくつかの実施形態において、前記LAMPプライマーセットは、少なくとも6種のプライマーを含む。いくつかの実施形態において、前記LAMPプライマーセットのプライマーは、配列番号19～162のいずれかで示される核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、前記LAMPプライマーセットは、FIPプライマーとBIPプライマーを含み、これらのプライマーのそれぞれは、配列番号19～162のいずれかから選択される核酸配列を有する。いくつかの実施形態において、前記LAMPプライマーセットは、F3プライマー、B3プライマー、FIPプライマー、BIPプライマー、LFプライマーおよびLBプライマーを含み、これらのプライマーのそれぞれが、配列番号19～162のいずれかで示される核酸配列を有する。

10

【0045】

いくつかの実施形態において、前記標的核酸は、デング熱ウイルス、A型インフルエンザウイルスH3N1株、A型インフルエンザウイルスH3N2株、インフルエンザ菌、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス1型、プラスモジウム属、バクテリオファージMS2、パルボウイルスB19、RSウイルス、サルモネラ・ティフィムリウムLT2株、ヒト型結核菌およびジカウイルスから選択されるウイルスまたは生物に由来する核酸である。

20

【0046】

いくつかの実施形態において、前記ポリメラーゼは、Bstラージフラグメント、Bca(exo-)ポリメラーゼ、Ventポリメラーゼ、Vent(exo-)ポリメラーゼ、Deep Ventポリメラーゼ、Deep Vent(exo-)ポリメラーゼ、phi29ファージポリメラーゼ、MS-2ファージポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Z-Taqポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、クレノウ断片、Bst2.0ポリメラーゼ(NEB社)、Bst3.0ポリメラーゼ(NEB社)、Bst誘導體、Bsuポリメラーゼ、Gspポリメラーゼ、Sauポリメラーゼおよびこれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの実施形態において、前記ポリメラーゼは、Bstラージフラグメントを含む。

30

【0047】

いくつかの実施形態において、前記試薬ミックスはクラウディング剤を含む。いくつかの実施形態において、前記クラウディング剤は、ポリエチレングリコール(PEG)、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンおよびフィコールから選択される。いくつかの実施形態において、前記クラウディング剤は、分子量35000のPEG、分子量8000のPEGおよび分子量400000のフィコールから選択される。いくつかの実施形態において、前記クラウディング剤は、分子量35000のPEGを含む。

40

【0048】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、ループ媒介等温増幅(LAMP)反応における標的核酸の検出用システムであって、前記水溶液のいずれかである水溶液を含む容器；および前記容器内の増幅産物を検出するように構成された検出器を含むシステムを含む。

いくつかの実施形態は、前記標的核酸をさらに含み。いくつかの実施形態において、前記検出器は、電気信号または光信号の変化を検出するように構成されている。いくつかの実

50

施形態において、前記検出器は、電気信号の変化を検出するように構成されている。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1A】 HAVFIP1オリゴヌクレオチド（配列番号1）の予測される二次構造を示す。

【0050】

【図1B】 伸長したHAVFIP1オリゴヌクレオチド（配列番号8）の予測される二次構造を示す。

【0051】

【図2】 配列番号1、配列番号1、配列番号94、配列番号15、配列番号11、配列番号17、配列番号13、配列番号16、配列番号107、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号10を含む、様々なオリゴヌクレオチドの予測される二次構造を示す。

10

【0052】

【図3】 様々なクラウディング剤を含む反応において様々な濃度の標的に対する臨界時間値（Ct）をまとめたグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0053】

本発明の実施形態は、非特異的増幅を低減するための、またはそれ以外の方法で等温増幅反応を改善するための方法、システムおよび組成物に関する。いくつかの実施形態は、特定のオリゴヌクレオチドを使用して、ループ媒介等温増幅（LAMP）反応における非特異的増幅を低減すること、またはその他の方法でLAMP反応を改善することに関する。いくつかの実施形態において、特定の阻害性オリゴヌクレオチドは、LAMP反応における非特異的増幅を低減する活性を有する。例えば、特定のLAMP反応では、阻害性オリゴヌクレオチドの存在により、非標的核酸の増幅を抑制することができる。このような実施形態のいくつかでは、阻害性オリゴヌクレオチドの存在下で行われたLAMP反応による非標的核酸の増幅は、阻害性オリゴヌクレオチドの非存在下で行われた反応での非標的核酸の増幅と比較して、大幅に増加した臨界時間値（Ct）で検出される。いくつかの実施形態では、阻害性オリゴヌクレオチドを反応に加えることによって、非標的核酸の増幅が阻害される。本明細書で提供する実施形態のいくつかは、国際特許出願公開WO 2016/057422、米国特許出願公開第2016/0097740号、米国特許出願公開第2016/0097741号、米国特許出願公開第2016/0097739号、米国特許出願公開第2016/0097742号および米国特許出願公開第2016/0130639号；ならびに米国特許出願第62/398959号、米国特許出願第62/399047号、米国特許出願第62/398925号、米国特許出願第62/398913号、米国特許出願第62/398955号または米国特許出願第62/398965号の優先権を主張する国際出願公開WO 2018/057647号に開示された実施形態を含む（これらの文献はいずれも引用によりその全体が本明細書に援用される）。また、本明細書で提供する実施形態のいくつかは、2018年12月20日に出願された「電気的検出を使用した等温増幅」という名称の米国特許出願第62/783117号、2018年12月20日に出願された「インピーダンスに基づく分析物検出用の携帯型診断検査システム」という名称の米国特許出願第62/783104号、または2018年12月20日に出願された「増幅産物を検出するための方法および組成物」という名称の米国特許出願第62/783051号に開示されている実施形態を含む（これらの文献の内容はいずれも引用によりその全体が本明細書に明示的に援用される）。

20

30

40

【0054】

用語の定義

本明細書において、「核酸」および/もしくは「オリゴヌクレオチド」という用語ならびに/または文法上これらと同等な用語は、互いに連結された少なくとも2つのヌクレオチドモノマーを指してもよい。一般に、核酸は、ホスホジエステル結合を含んでいてもよい。しかし、いくつかの実施形態において、核酸類似体は、その他の種類の骨格を有していてもよく、例えば、ホスホルアミド（Beaucage, et al., Tetrahedron, 49:1925 (1993); Letsinger, J. Org. Chem., 35:3800 (1970); Sprinzl, et al., Eur. J.

50

Biochem., 81:579 (1977); Letsinger, et al., Nucl. Acids Res., 14:3487 (1986); Sawai, et al., Chem. Lett., 805 (1984), Letsinger, et al., J. Am. Chem. Soc., 110:4470 (1988); および Pauwels, et al., *Chemica Scripta*, 26:141 (1986)、ホスホロチオエート (Mag, et al., *Nucleic Acids Res.*, 19:1437 (1991); および米国特許第5,644,048号)、ホスホロジチオエート (Briu, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 111:2321 (1989))、O - メチルホスホロアミダイト結合 (Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Pressを参照されたい)、ペプチド核酸骨格およびペプチド核酸結合 (Egholm, *J. Am. Chem. Soc.*, 114:1895 (1992); Meier, et al., *Chem. Int. Ed. Engl.*, 31:1008 (1992); Nielsen, *Nature*, 365:566 (1993); Carlsson, et al., *Nature*, 380:207 (1996)を参照されたい) などを含む骨格を有していてもよい。

【0055】

その他の核酸類似体として、正電荷の骨格を有する核酸類似体 (Denpcy, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:6097 (1995))、非イオン性の骨格を有する核酸類似体 (米国特許第5,386,023号; 米国特許第5,637,684号; 米国特許第5,602,240号; 米国特許第5,216,141号; 米国特許第4,469,863号; Kiedrowski, et al., *Angew. Chem. Intl. Ed. English*, 30:423 (1991); Letsinger, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 110:4470 (1988); Letsinger, et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 13:1597 (1994); ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research"の第2章および第3章, Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker, et al., *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.*, 4:395 (1994); Jeffs, et al., *J. Biomolecular NMR*, 34:17 (1994); *Tetrahedron Lett.*, 37:743 (1996))、およびリボース以外の核酸類似体 (米国特許第5,235,033号および米国特許第5,034,506号ならびにASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research"の第6章および第7章, Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook) が挙げられる。また、核酸は、1つ以上の炭素環式糖を含有していてもよい (Jenkins, et al., *Chem. Soc. Rev.*, (1995) pp. 169-176を参照されたい)。

【0056】

リボース - リン酸骨格の修飾は、標識などの追加の部分の付加を容易にするために行ってもよく、特定の条件下でこのような分子の安定性を高めるために行ってもよい。さらに、天然の核酸と類似体の混合物を作製することができる。別法として、様々な核酸類似体の混合物、および天然の核酸と類似体の混合物を作製することができる。核酸は、本明細書で述べるように、一本鎖核酸または二本鎖核酸であってもよく、二本鎖配列の一部および一本鎖配列の一部の両方を含んでいてもよい。核酸はDNAであってもよく、例えば、ゲノムDNA、cDNA、RNAまたはハイブリッドであってもよく、これらは、単一の細胞から得られたものであってもよく、複数の種類の細胞から得られたものであってもよく、メタゲノム試料と同様に、環境試料などに由来する複数の生物種から得られたものであってもよい。また、核酸は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドのどのような組み合わせを含んでいてもよく、ウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサントシン (xanthanine)、ヒポキサントシン (hypoxanthanine)、イソシトシン、イソグアニンなどの塩基のどのような組み合わせを含んでいてもよく、ニトロピロール (3 - ニトロピロールを含む) やニトロインドール (5 - ニトロインドールを含む) などの塩基類似体を含んでいてもよい。

【0057】

いくつかの実施形態において、核酸は、少なくとも1つのpromiscuousな塩基を含むことができる。promiscuousな塩基は、2種類以上の塩基と塩基対合することができる。いくつかの実施形態において、promiscuousな塩基は、少なくとも2種類の塩基と塩基対合ことができ、かつ3種類以下の塩基と塩基対合することができる。promiscuousな塩基の例としては、アデニン、チミンまたはシトシンと対合を形成しうるイノシン

が挙げられる。その他の例としては、ヒポキサンチン、5 - ニトロインドール、アシル化5 - ニトロインドール、4 - ニトロピラゾール、4 - ニトロイミダゾールおよび3 - ニトロピロールが挙げられる (Loakes et al., *Nucleic Acid Res.* 22:4039 (1994); Van Aerschot et al., *Nucleic Acid Res.* 23:4363 (1995); Nichols et al., *Nature* 369:492 (1994); Bergstrom et al., *Nucleic Acid Res.* 25:1935 (1997); Loakes et al., *Nucleic Acid Res.* 23:2361 (1995); Loakes et al., *J. Mol. Biol.* 270:426 (1997); および Fotin et al., *Nucleic Acid Res.* 26:1515 (1998))。少なくとも3種類、少なくとも4種類またはそれ以上の種類の塩基と塩基対合することができるpromiscuousな塩基を使用することもできる。

【0058】

本明細書において、「ヌクレオチド類似体」という用語および/または文法上これと同等な用語は、修飾されたヌクレオチド塩基部分、修飾されたペントース部分および/または修飾されたリン酸部分を有する合成類似体を指してもよく、本明細書の別の箇所で概説するように、ポリヌクレオチドの場合は、修飾されたヌクレオチド間結合を有する合成類似体を指してもよい(例えば、Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York, 1980; Englisch, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30:613-29, 1991; Agarwal, *Protocols for Polynucleotides and Analogs*, Humana Press, 1994; および S. Verma and F. Eckstein, *Ann. Rev. Biochem.* 67:99-134, 1998を参照されたい)。一般に、修飾されたリン酸部分は、リン原子の酸化数が+5であり、かつ酸素原子の1つ以上が酸素以外の部分(例えば硫黄)で置換されたリン酸類似体を含む。リン酸類似体の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニリデート、ホスホロアミデートおよびボロノホスフェートが挙げられるが、これらに限定されず、関連する対イオンが存在する場合、例えば、 H^+ 、 NH_4^+ 、 Na^+ などの対イオンが含まれる。修飾されたヌクレオチド塩基部分の例としては、5 - メチルシトシン(5mC); C5 - プロピニル - CやC5 - プロピニル - UなどのC5 - プロピニル類似体; 2, 6 - ジアミノプリン(2 - アミノアデニンまたは2 - アミノ - dAとしても知られている); ヒポキサンチン、シュードウリジン、2 - チオピリミジン、イソシトシン(isoC)、5 - メチルisoCおよびイソグアニン(isoG; 例えば、米国特許第5,432,272号を参照されたい)が挙げられるが、これらに限定されない。修飾されたペントース部分の例としては、Bz-A-LNA、5-Me-Bz-C-LNA、dmf-G-LNA、T-LNAなどの(ただしこれらに限定されない)ロックド核酸(LNA)類似体(例えば、*The Glen Report*, 16(2):5, 2003; Koshkin et al., *Tetrahedron* 54:3607-30, 1998を参照されたい); および2'位または3'位が、水素、ヒドロキシ、アルコキシ(例えば、メトキシ、エトキシ、アリロキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシもしくはフェノキシなど)、アジド、アミノ、アルキルアミノ、フルオロ、クロロまたはプロモである2'位修飾核酸または3'位修飾核酸が挙げられるが、これらに限定されない。修飾されたヌクレオチド間結合として、リン酸類似体、アキラルなサブユニット間結合もしくは非荷電サブユニット間結合を有する類似体(例えば、Sterchak, E. P. et al., *Organic Chem.*, 52:4202, 1987を参照されたい)、またはアキラルなサブユニット間結合を有する非荷電モルホリノ系ポリマー(例えば、米国特許第5,034,506号を参照されたい)が挙げられる。いくつかのヌクレオチド間結合類似体として、モルホリデート結合複素環、アセタール結合複素環およびポリアミド結合複素環が挙げられる。疑似相補的ペプチド核酸などの、ペプチド核酸(「PNA」)として知られているヌクレオチド類似体の一分類では、従来の糖およびヌクレオチド間結合が、2 - アミノエチルグリシンアミド骨格ポリマーで置換されたものが知られている(例えば、Nielsen et al., *Science*, 254:1497-1500, 1991; Egholm et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 114: 1895-1897 1992; Demidov et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:5953-58, 2002; *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*, Nielsen, ed., Horizon Bioscience, 2004を参照されたい)。特定の実施形態は、米国特許第9,109,226号に開示されている態様を含み、この文献

10

20

30

40

50

は引用によりその全体が本明細書に援用される。

【0059】

特定の阻害性オリゴヌクレオチド

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、ループ媒介等温増幅(LAMP)反応などの等温増幅反応において非特異的増幅を低減または阻害する活性を有するオリゴヌクレオチドを含む。このオリゴヌクレオチドは、DNAもしくはRNA、またはヌクレオチド類似体を含むことができる。いくつかの実施形態では、このオリゴヌクレオチドは、分子内ヘアピン構造を含むか、分子内ヘアピン構造からなるか、または実質的に分子内ヘアピン構造からなると予測される核酸配列を有することができる。本明細書において、「ヘアピン」は、一本鎖オリゴヌクレオチドの第1の部分の相補的塩基が、同じオリゴヌクレオチドの第2の部分の塩基とハイブリダイズして、相補的塩基間で分子内塩基対合を有するステム構造を形成することによって形成された二次構造を指してもよい。いくつかの実施形態では、前述のオリゴヌクレオチドに沿って分子内塩基対合が形成されないことによって、ステム構造に隣接したループ構造が形成される場合がある。いくつかの実施形態では、このループ構造は、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、またはそれ以上の個数の連続するヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態において、このオリゴヌクレオチドは、ヘアピン構造やループ構造の一部を形成しないと予測される部分を含むことができる。例えば、いくつかのオリゴヌクレオチドは、連続する少なくとも1個、5個、10個、20個もしくは25個のヌクレオチド、または連続するこれらの個数のヌクレオチドのいずれか2つを上下限とする範囲内の任意の個数のヌクレオチドがヘアピン構造から伸長した5'末端または3'末端を含むことができる。いくつかの実施形態では、予測されるヘアピン構造の予測される融解温度(T_m)は、40、45、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70もしくは75よりも高くてもよく、これらの温度のいずれか2つを上下限とする範囲内の T_m よりも高くてもよく、または40、45、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70もしくは75よりも低くてもよく、これらの温度のいずれか2つを上下限とする範囲内の T_m よりも低くてもよい。このような実施形態のいくつかでは、予測されるヘアピン構造は、二本鎖領域、ステム領域またはループを含むか、このような構造からなる。このような実施形態のいくつかにおいて、前記二本鎖領域は、ヌクレオチドが非対合であるミスマッチヌクレオチドからなるバブルを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、バブルは、二本鎖領域の二本鎖のうち一方に、少なくとも0個、少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個もしくは少なくとも10個のミスマッチヌクレオチド、または0個以下、1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個以下、9個以下もしくは10個以下のミスマッチヌクレオチドを含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、二本鎖領域は、少なくとも0個、少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個もしくは少なくとも4個のバブル、または0個以下、1個以下、2個以下、3個以下もしくは4個以下のバブルを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、等温増幅反応において非特異的増幅を低減および/または阻害する活性を有するオリゴヌクレオチドは、LAMP反応などの増幅反応において標的核酸に特異的にハイブリダイズしない。

【0060】

いくつかの実施形態では、等温増幅反応において非特異的増幅を低減または阻害する活性を有するオリゴヌクレオチド(例えば阻害性オリゴヌクレオチド)は、特定の核酸配列と配列同一性を有する核酸配列を含んでいてもよく、このような核酸配列からなってもよく、または実質的にこのような核酸配列からなってもよい。いくつかの実施形態において、阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~15のいずれかから選択される核酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%

の配列同一性、またはこれらのパーセンテージのいずれか2つを上下限とする範囲内の任意のパーセンテージの配列同一性を有する核酸配列を含んでいてもよく、このような核酸配列からなっているとしてもよく、または実質的にこのような核酸配列からなっているとしてもよい。いくつかの実施形態において、阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~10のいずれかから選択される核酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の配列同一性、またはこれらのパーセンテージのいずれか2つを上下限とする範囲内の任意のパーセンテージの配列同一性を有する核酸配列を含んでいてもよく、このような核酸配列からなっているとしてもよく、または実質的にこのような核酸配列からなっているとしてもよい。いくつかの実施形態において、阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号9のヌクレオチド配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の配列同一性、またはこれらのパーセンテージのいずれか2つを上下限とする範囲内の任意のパーセンテージの配列同一性を有する核酸配列を含んでいてもよく、このような核酸配列からなっているとしてもよく、または実質的にこのような核酸配列からなっているとしてもよい。いくつかの実施形態において、阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオチド配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の配列同一性、またはこれらのパーセンテージのいずれか2つを上下限とする範囲内の任意のパーセンテージの配列同一性を有する核酸配列を含んでいてもよく、このような核酸配列からなっているとしてもよく、または実質的にこのような核酸配列からなっているとしてもよい。いくつかの実施形態において、阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号2のヌクレオチド配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の配列同一性、またはこれらのパーセンテージのいずれか2つを上下限とする範囲内の任意のパーセンテージの配列同一性を有する核酸配列を含んでいてもよく、このような核酸配列からなっているとしてもよく、または実質的にこのような核酸配列からなっているとしてもよい。

10

20

30

40

50

【0061】

いくつかの実施形態では、等温増幅反応において非特異的増幅を低減または阻害する活性を有するオリゴヌクレオチド（例えば阻害性オリゴヌクレオチド）は、特定の核酸配列の相補鎖にハイブリダイズすることができる核酸配列を含んでいてもよく、このような核酸配列からなっているとしてもよく、または実質的にこのような核酸配列からなっているとしてもよい。例えば、核酸は、所定の条件下で別の核酸にハイブリダイズすることができる配列を有することができる。ハイブリダイゼーションは、適切な条件下で、十分に相補的な配列を有する2つのポリヌクレオチドが、安定した特異的な水素結合を有する二本鎖を形成することができるプロセスを含む。標的ポリヌクレオチドに「ハイブリダイズ可能な」プローブポリヌクレオチドは、状況に応じて公知の方法で決定することができるハイブリダイゼーション条件下で標的ポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができる。ハイブリダイゼーションは、ストリンジェンシーが高いほど、より特異的なものとなる。ストリンジェンシーは、特に、プローブ/標的二重鎖の塩基組成に依存して規定され、2つの核酸間のミスマッチの程度によっても規定される。また、ストリンジェンシーは、ハイブリダイゼーション溶液中に存在するイオン種の濃度および種類、変性剤の特性および濃度またはハイブリダイゼーション温度などの反応パラメータの関数であってもよい。ハイブリダイゼーション反応を行う際の条件のストリンジェンシーは、主に、使用するプローブ/標的に依存する。一般に、ハイブリダイゼーション反応の温度は、使用する核酸の長さに応じて、約20~65であり、特に、約0.08~1Mの濃度の生理食塩水中で35~65である。

【0062】

いくつかの実施形態では、阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~15のいずれかから選択される配列を有する核酸の相補鎖にハイブリダイズすることができる核酸配列を含んでいてもよく、この核酸配列からなっているとしてもよく、または実質的にこの核酸配列からなっているとしてもよい。いくつかの実施形態では、阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~10のいずれかから選択される配列を有する核酸の相補鎖にハイブリダイズすることが

できる核酸配列を含んでいてもよく、この核酸配列からなってもよく、または実質的にこの核酸配列からなってもよい。いくつかの実施形態では、阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号9で示される配列を有する核酸の相補鎖にハイブリダイズすることができる核酸配列を含んでいてもよく、この核酸配列からなってもよく、または実質的にこの核酸配列からなってもよい。いくつかの実施形態では、阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1で示される配列を有する核酸の相補鎖にハイブリダイズすることができる核酸配列を含んでいてもよく、この核酸配列からなってもよく、または実質的にこの核酸配列からなってもよい。いくつかの実施形態では、阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号2で示される配列を有する核酸の相補鎖にハイブリダイズすることができる核酸配列を含んでいてもよく、この核酸配列からなってもよく、または実質的にこの核酸配列からなってもよい。

10

【0063】

いくつかの実施形態では、阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~15のいずれかから選択される核酸配列を含んでいてもよく、この核酸配列からなってもよく、または実質的にこの核酸配列からなってもよい。いくつかの実施形態では、阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~10のいずれかから選択される核酸配列を含んでいてもよく、この核酸配列からなってもよく、または実質的にこの核酸配列からなってもよい。いくつかの実施形態では、阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号9のヌクレオチド配列を含んでいてもよく、このヌクレオチド配列からなってもよく、または実質的にこのヌクレオチド配列からなってもよい。いくつかの実施形態では、阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオチド配列を含んでいてもよく、このヌクレオチド配列からなってもよく、または実質的にこのヌクレオチド配列からなってもよい。いくつかの実施形態では、阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号2のヌクレオチド配列を含んでいてもよく、このヌクレオチド配列からなってもよく、または実質的にこのヌクレオチド配列からなってもよい。

20

【0064】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ウラシルまたはイノシンを含むヌクレオチドを含んでいない。

【0065】

いくつかの実施形態において、阻害性オリゴヌクレオチドは、ブロック部分を含んでいてもよい。例えば、阻害性オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの伸長を阻止するブロック部分を含んでいてもよい。本明細書において、「ブロック部分」という用語は、ヌクレオチド類似体に関して使用される場合、ヌクレオチド類似体が第2のヌクレオチド類似体と共有結合を形成するのを阻害または阻止する該ヌクレオチド類似体の一部を指す。例えば、ペントース部分を有するヌクレオチド類似体の場合、ブロック部分は、ヌクレオチド類似体の3'位の酸素と、第2のヌクレオチド類似体の5'位のリン酸との間のホスホジエステル結合の形成を阻止することができる。ブロック部分は、核酸ポリマー中に存在するモノマー単位であるヌクレオチド類似体の一部であってもよく、遊離ヌクレオチド類似体(例えば、ヌクレオチド三リン酸)の一部であってもよい。ブロック部分が、ヌクレオチド類似体の一部である場合、このブロック部分は可逆的ブロック部分であってもよく、この可逆的ブロック部分を除去または修飾することによって、このヌクレオチド類似体は第2のヌクレオチド類似体と共有結合を形成することができる。特に有用な可逆的ブロック部分は、リン酸塩、リン酸エステル、アルキルアジド、アセタール、エステル、エーテルなどである。いくつかの実施形態では、可逆的ブロック部分などのブロック部分を、ヌクレオチド類似体のペントース部分の3'位または2'位に結合させることができる。いくつかの実施形態において、ブロック部分は、阻害性オリゴヌクレオチドから容易に除去することができる。いくつかの実施形態において、阻害性オリゴヌクレオチドは、例えば、その3'末端などにおいてリン酸化することができる。ブロック部分の例は、米国特許第20180312917号に開示されており、この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される。

30

40

50

【 0 0 6 6 】

特定の組成物

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、水溶液を含む。いくつかの実施形態において、この水溶液は、本明細書で提供する第1の阻害性オリゴヌクレオチド（ヘアピンを含む阻害性オリゴヌクレオチドなど）を含むことができる。いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドは、標的核酸に特異的にハイブリダイズしない。いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドは、該第1の阻害性オリゴヌクレオチドの非存在下でLAMP反応を行った場合と比べて、LAMP反応の非特異的増幅産物の量を低減させる活性を有する。いくつかの実施形態において、前記水溶液は、標的核酸のLAMP反応を行うのに十分なLAMPプライマーセットをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記水溶液は、LAMP反応に適したポリメラーゼなどのポリメラーゼをさらに含む。

10

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドは、その3'末端に、ポリメラーゼによる該第1の阻害性オリゴヌクレオチドの伸長を阻害するブロック部分を含む。ブロック部分の例は本明細書において提供されており、ブロック部分の例として、リン酸塩、C3スパーサー、アミン、ビオチンおよび逆位(inverted)塩基が挙げられる。いくつかの実施形態では、第1の阻害性オリゴヌクレオチドの3'末端はリン酸化されている。

【 0 0 6 8 】

いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドは、ウラシルまたはイノシンを含むヌクレオチドを含んでいない。

20

【 0 0 6 9 】

いくつかの実施形態において、ヘアピン構造の予測される融解温度(T_m)は、40、45、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70 もしくは75よりも高くてもよく、これらの温度のいずれか2つを上下限とする範囲内の T_m よりも高くてもよく、または40、45、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70 もしくは75よりも低くてもよく、これらの温度のいずれか2つを上下限とする範囲内の T_m よりも低くてもよい。いくつかの実施形態では、ヘアピンの T_m は、約65未満である。いくつかの実施形態では、ヘアピンの T_m は、約55未満である。いくつかの実施形態では、ヘアピンの T_m は、約50～約60の範囲である。いくつかの実施形態では、ヘアピンの T_m は、50～60の範囲である。

30

【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドは一本鎖であり、該3'末端ヌクレオチドに続くヌクレオチドは二本鎖である。

【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドのヘアピンは、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、25個、30個、35個、40個、45個または50個の連続するヌクレオチドからなる一本鎖を含むループ、またはこの一本鎖からなるループを含む。いくつかの実施形態において、ヘアピンは、連続する3個のヌクレオチドからなる一本鎖を含むループ、または連続する3個のヌクレオチドからなる一本鎖からなるループを含む。

40

【 0 0 7 2 】

いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1～15のいずれかから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸；配列番号1～15のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように

50

構成された核酸；または配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。いくつかの実施形態において、第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号 9 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；配列番号 9 のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号 9 のヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。いくつかの実施形態において、第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；配列番号 1 のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号 1 のヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。いくつかの実施形態において、第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号 2 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；配列番号 2 のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号 2 のヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。

10

【0073】

いくつかの実施形態において、LAMP 試薬ミックスは、第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドをさらに含む。

20

【0074】

いくつかの実施形態において、第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドは、その 3' 末端に、ポリメラーゼによる該第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドの伸長を阻害するブロック部分を含む。

【0075】

いくつかの実施形態において、第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドの 3' 末端はリン酸化されている。

【0076】

いくつかの実施形態において、第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドの 3' 末端ヌクレオチドは一本鎖であり、該 3' 末端ヌクレオチドに続くヌクレオチドは二本鎖である。

30

【0077】

いくつかの実施形態において、前記水溶液中における第 1 の阻害性オリゴヌクレオチドと第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドの比率は、1 : 10 ~ 1 : 1 の範囲である。いくつかの実施形態において、この比率は、1 : 5 もしくは 1 : 5 であるか、または約 1 : 5 もしくは約 1 : 5 である。

【0078】

いくつかの実施形態において、第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号 1 ~ 15 のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。いくつかの実施形態において、第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号 9 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸；配列番号 9 のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号 9 のヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。いくつかの実施形態において、第 2 の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% の配列同一性を有

40

50

する核酸；配列番号1のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号1のヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。いくつかの実施形態において、第2の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号2のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸；配列番号2のヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖とハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖とハイブリダイズするように構成された核酸；または配列番号2のヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。

【0079】

さらに、いくつかの実施形態は、クラウディング剤を含む水溶液を含む。いくつかの実施形態において、クラウディング剤は、ポリエチレングリコール(PEG)、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンおよびフィコールから選択される。いくつかの実施形態では、クラウディング剤は、分子量35000のPEG、分子量8000のPEGおよび分子量400000のフィコールから選択される。いくつかの実施形態では、クラウディング剤は、分子量35000のPEGを含む。

【0080】

いくつかの実施形態において、前記ポリメラーゼは、LAMP反応に適したものである。いくつかの実施形態において、前記ポリメラーゼは、鎖置換活性を含む。いくつかの実施形態において、前記ポリメラーゼは、Bstラージフラグメント、Bca(exo-)ポリメラーゼ、Ventポリメラーゼ、Vent(exo)ポリメラーゼ、Deep Ventポリメラーゼ、Deep Vent(exo-)ポリメラーゼ、phi29ファージポリメラーゼ、MS-2ファージポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Z-Taqポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、クレノウ断片、Bst 2.0ポリメラーゼ、Bst 3.0ポリメラーゼ、Bst誘導體、Bsuポリメラーゼ、Gspポリメラーゼ、Sauポリメラーゼおよびこれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの実施形態において、前記ポリメラーゼは、Bstラージフラグメントを含む。

【0081】

いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドの濃度は、 $0.1 \mu\text{M} \sim 20 \mu\text{M}$ または約 $0.1 \mu\text{M} \sim 20 \mu\text{M}$ の範囲である。いくつかの実施形態において、第2の阻害性オリゴヌクレオチドの濃度は、 $0.1 \mu\text{M} \sim 20 \mu\text{M}$ または約 $0.1 \mu\text{M} \sim 20 \mu\text{M}$ の範囲である。

【0082】

さらに、いくつかの実施形態は、複数の異なるLAMPプライマーセットを含む水溶液を含み、各LAMPプライマーセットは、それぞれ別の標的核酸のLAMP反応を行うのに十分である。いくつかの実施形態において、前記LAMPプライマーセットのプライマーは、配列番号19~162のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記LAMPプライマーセットは、F3プライマー、B3プライマー、FIPプライマー、BIPプライマー、LFプライマーおよびLBプライマーを含み、これらのプライマーのそれぞれは、配列番号19~162のいずれかから選択されるヌクレオチド配列を有する。

【0083】

いくつかの実施形態において、前記標的核酸は、デング熱ウイルス、A型インフルエンザウイルスH3N1株、A型インフルエンザウイルスH3N2株、インフルエンザ菌、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス1型、プラスモジウム属、バクテリオファージMS2、パルボウイルスB19、RSウイルス、サルモネラ・ティフィムリウムLT2株、ヒト型結核菌およびジカウイルスから選択されるウイルスまたは生物に由来する核酸である。

【0084】

いくつかの実施形態において、第1の阻害性オリゴヌクレオチドは、該第1の阻害性オリゴヌクレオチドの非存在下で行ったLAMP反応と比べて、LAMP反応における偽陽性の増

10

20

30

40

50

幅の臨界時間値 (Ct) を増加させる活性を有する。いくつかの実施形態では、前記増加は、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍または10倍である。いくつかの実施形態では、前記増加は少なくとも2倍である。いくつかの実施形態では、前記増加は少なくとも3倍である。いくつかの実施形態において、前記増加は、少なくとも1分、2分、3分、4分、5分、6分、7分、8分、9分、10分、11分、12分、13分、14分、15分、16分、17分、18分、19分または20分である。

【0085】

非特異的増幅を低減するための特定の方法

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、LAMP反応などの等温増幅反応において非特異的増幅を低減する方法を含む。いくつかの実施形態において、LAMP反応は、標的核酸を特異的に増幅する。いくつかの実施形態において、本明細書で提供する阻害性オリゴヌクレオチドの存在下で行われたLAMP反応における非特異的増幅の量は、該阻害性オリゴヌクレオチドの非存在下で行われたLAMP反応と比べて低減している。いくつかの実施形態において、非特異的増幅は、増幅反応において偽陽性として検出される場合がある。

10

【0086】

LAMP反応において非特異的増幅を低減する方法の実施形態のいくつかは、LAMP試薬ミックスを提供する工程を含んでもよい。いくつかの実施形態では、LAMP試薬ミックスは、標的核酸を増幅するのに十分な試薬を含んでもよい。このような試薬の例として、F3プライマー、B3プライマー、FIPプライマー、BIPプライマー、LFプライマー、LBプライマーなどの、標的核酸のLAMP反応を行うのに十分なLAMPプライマーセット；および鎖置換活性を含むポリメラーゼなどのポリメラーゼが挙げられる。いくつかの実施形態において、前記ポリメラーゼは、Bstラージフラグメント、Bca (exo -) ポリメラーゼ、Ventポリメラーゼ、Vent (exo -) ポリメラーゼ、Deep Ventポリメラーゼ、Deep Vent (exo -) ポリメラーゼ、phi29ファージポリメラーゼ、MS-2ファージポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Z-Taqポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、クレノウ断片およびこれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの実施形態において、前記ポリメラーゼは、Bst2.0ポリメラーゼ (NEB社)、Bst3.0ポリメラーゼ (NEB社)、Bst誘導體、Bsuポリメラーゼ、GspポリメラーゼおよびSauポリメラーゼから選択することができる。いくつかの実施形態において、前記ポリメラーゼは、Bstラージフラグメントを含む。

20

30

【0087】

いくつかの実施形態では、前記試薬ミックスは、クラウディング剤を含んでもよい。クラウディング剤の例としては、分子量1450のPEG、分子量3000のPEG、分子量8000のPEG (PEG-8K)、分子量10000のPEG、分子量14000のPEG、分子量15000のPEG、分子量20000のPEG、分子量250000のPEG、分子量30000のPEG、分子量350000のPEG (PEG-35K)、分子量40000のPEG (PEG-400K) などのポリエチレングリコール (PEG)；デキストラン；ポリビニルアルコール；ポリビニルピロリドン；およびフィコールが挙げられる。いくつかの実施形態において、クラウディング剤は、分子量35000のPEG、分子量8000のPEGおよび分子量400000のフィコールから選択される。いくつかの実施形態では、クラウディング剤は分子量35000のPEGを含む。いくつかの実施形態において、LAMP反応におけるクラウディング剤の濃度は、反応物の重量または体積に対して1~12%であり、例えば、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%、10.0%、10.5%、11.0%、11.5%、12.0%、12.5%、13%、13.5%、14%、14.5%、15%および20%から選択される2つの濃度値を上下限とする範囲内の濃度である。

40

【0088】

いくつかの実施形態において、LAMP反応は、阻害性オリゴヌクレオチドの存在下で行われる。いくつかの実施形態において、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~1

50

5から選択される核酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の配列同一性、またはこれらのパーセンテージのいずれか2つを上下限とする範囲内の任意のパーセンテージの配列同一性を有する核酸配列を含んでいてもよく、このような核酸配列からなってもよく、または実質的にこのような核酸配列からなってもよい。いくつかの実施形態では、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~10から選択される核酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の配列同一性、またはこれらのパーセンテージのいずれか2つを上下限とする範囲内の任意のパーセンテージの配列同一性を有する核酸配列を含んでいてもよく、このような核酸配列からなってもよく、または実質的にこのような核酸配列からなってもよい。いくつかの実施形態では、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号9のヌクレオチド配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の配列同一性、またはこれらのパーセンテージのいずれか2つを上下限とする範囲内の任意のパーセンテージの配列同一性を有する核酸配列を含んでいてもよく、このような核酸配列からなってもよく、または実質的にこのような核酸配列からなってもよい。いくつかの実施形態では、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオチド配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の配列同一性、またはこれらのパーセンテージのいずれか2つを上下限とする範囲内の任意のパーセンテージの配列同一性を有する核酸配列を含んでいてもよく、このような核酸配列からなってもよく、または実質的にこのような核酸配列からなってもよい。いくつかの実施形態では、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~15のいずれかから選択される配列を有する核酸の相補鎖にハイブリダイズすることができる核酸配列を含んでいてもよく、この核酸配列からなってもよく、または実質的にこの核酸配列からなってもよい。いくつかの実施形態では、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~10のいずれかから選択される配列を有する核酸の相補鎖にハイブリダイズすることができる核酸配列、もしくはこの相補鎖にハイブリダイズするように構成された核酸配列を含んでいてもよく、これらの核酸配列のいずれかからなってもよく、または実質的にこれらの核酸配列のいずれかからなってもよい。いくつかの実施形態では、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号9で示される配列を有する核酸の相補鎖にハイブリダイズすることができる核酸配列、もしくはこの相補鎖にハイブリダイズするように構成された核酸配列を含んでいてもよく、これらの核酸配列のいずれかからなってもよく、または実質的にこれらの核酸配列のいずれかからなってもよい。いくつかの実施形態では、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1で示される配列を有する核酸の相補鎖にハイブリダイズすることができる核酸配列、もしくはこの相補鎖にハイブリダイズするように構成された核酸配列を含んでいてもよく、これらの核酸配列のいずれかからなってもよく、または実質的にこれらの核酸配列のいずれかからなってもよい。いくつかの実施形態では、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~15のいずれかから選択される核酸配列を含んでいてもよく、この核酸配列からなってもよく、または実質的にこの核酸配列からなってもよい。いくつかの実施形態では、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~10のいずれかから選択される核酸配列を含んでいてもよく、この核酸配列からなってもよく、または実質的にこの核酸配列からなってもよい。いくつかの実施形態では、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号9のヌクレオチド配列を含んでいてもよく、このヌクレオチド配列からなってもよく、または実質的にこのヌクレオチド配列からなってもよい。いくつかの実施形態では、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオチド配列を含んでいてもよく、このヌクレオチド配列からなってもよく、または実質的にこのヌクレオチド配列からなってもよい。いくつかの実施形態において、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、伸長を阻止するためのブロック部分を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、前記阻害性オリゴヌクレオチドは、例えば、その3'末端などにおいてリン酸化することができる。

【0089】

いくつかの実施形態において、LAMP反応における阻害性オリゴヌクレオチドの濃度は、約0.01 μM ~ 100 μM、約0.1 μM ~ 約20 μM、0.01 μM ~ 100 μMまたは0.1 μM ~ 約20 μMの範囲であってもよい。いくつかの実施形態では、LAMP反応における阻害性オリゴヌクレオチドの濃度は、1 μM、2 μM、3 μM、4 μM、5 μM、6 μM、7 μM、8 μM、9 μM、10 μM、11 μM、12 μM、13 μM、14 μM、15 μM、16 μM、17 μM、18 μM、19 μMもしくは20 μM、またはこれらの濃度のいずれか2つを上下限とする範囲内であってもよい。

【0090】

いくつかの実施形態において、LAMP反応は、少なくとも2種の阻害性オリゴヌクレオチドの組み合わせの存在下で行ってもよい。いくつかの実施形態において、前記少なくとも2種の阻害性オリゴヌクレオチドはそれぞれ、配列番号1 ~ 15のいずれかから選択される核酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の配列同一性、またはこれらのパーセンテージのいずれか2つを上下限とする範囲内の任意のパーセンテージの配列同一性を有する核酸配列を含むか、このような核酸配列からなるか、または実質的にこのような核酸配列からなる。いくつかの実施形態において、前記少なくとも2種の阻害性オリゴヌクレオチドはそれぞれ、配列番号1 ~ 15のいずれかから選択される配列を有する核酸の相補鎖にハイブリダイズすることができる核酸、もしくはこの相補鎖にハイブリダイズするように構成された核酸を含むか、これらの核酸のいずれかからなるか、または実質的にこれらの核酸のいずれかからなる。いくつかの実施形態において、前記少なくとも2種の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオチド配列を有する阻害性オリゴヌクレオチドと、配列番号2のヌクレオチド配列を有する阻害性オリゴヌクレオチドとを含む。いくつかの実施形態において、前記少なくとも2種の阻害性オリゴヌクレオチドのうち1種以上はリン酸化されている。

【0091】

いくつかの実施形態では、LAMP試薬ミックス中などでのLAMP反応における前記少なくとも2種の阻害性オリゴヌクレオチドの濃度の比率は、1 : 10 ~ 1 : 1、1 : 8 ~ 1 : 2、または1 : 6 ~ 1 : 4の範囲であってもよい。いくつかの実施形態では、LAMP試薬ミックス中などでのLAMP反応における前記少なくとも2種の阻害性オリゴヌクレオチドの濃度の比率は、1 : 5であってもよい。

【0092】

いくつかの実施形態において、LAMP試薬ミックスは、単一の標的核酸を増幅するのに十分な単一のLAMPプライマーセットを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、LAMP試薬ミックスは、複数のLAMPプライマーセットを含むことができ、各LAMPプライマーセットは、それぞれ別の単一の標的核酸を増幅するのに十分である。いくつかの実施形態では、LAMPプライマーセットのプライマーは、配列番号19 ~ 156のいずれかから選択される核酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の配列同一性、またはこれらのパーセンテージのいずれか2つを上下限とする範囲内の任意のパーセンテージの配列同一性を有する核酸配列を含んでいてもよく、このような核酸配列からなってもよく、または実質的にこのような核酸配列からなってもよい。

【0093】

いくつかの実施形態において、標的核酸は、LAMP反応で増幅される目的の核酸配列を含んでいてもよい。標的核酸の例として、デング熱ウイルス、A型インフルエンザウイルスH3N1株、A型インフルエンザウイルスH3N2株、インフルエンザ菌、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス1型、プラスモジウム属、バクテリオファージMS2、パルボウイルスB19、RSウイルス、サルモネラ・ティフィムリウムLT2株、ヒト型結核菌、ジカウイルスなどのウイルスまたは生物に由来する核酸配列が挙げられる。

【0094】

いくつかの実施形態では、LAMP試薬ミックスなどのLAMP反応物は、所望の結果を達成

10

20

30

40

50

するのに十分な所望の濃度の各成分および/または各試薬を含んでいてもよい。このような各成分は、この目的を達成するため、個々にまたは別個に最適化してもよい。多重反応を行う場合、個々のアッセイに対して必要に応じてプライマーの総濃度を最適化してもよい。多重アッセイまたは多重反応の場合、各試薬の濃度は、単一のアッセイを行う場合の濃度と同じままであってもよく、特定の用途に適するように変更してもよい。いくつかの実施形態では、標準的なLAMP反応における各試薬の濃度は、本明細書で述べるような濃度であってもよく、各プライマーセットまたは各プローブセットは合計n個のうちの1個を示す(ここで、nは特定の分析で評価される標的の数およびこれに対応するプライマーセットの数である)。

【0095】

いくつかの実施形態では、LAMP反応を行う際の反応液量は、どのような量であってもよく、例えば、反応液量は、少なくとも0.25 μ L、0.5 μ L、1 μ L、2 μ L、3 μ L、4 μ L、5 μ L、10 μ L、15 μ L、20 μ L、25 μ L、30 μ L、35 μ L、40 μ L、45 μ L、50 μ L、60 μ L、70 μ L、80 μ L、90 μ L、100 μ L、125 μ L、150 μ L、175 μ L、200 μ L、250 μ L、300 μ L、350 μ L、400 μ L、450 μ L、500 μ Lもしくは1 mL、またはこれらの量のいずれか2つを上下限とする範囲内の任意の量であってもよい。

【0096】

いくつかの実施形態では、標的核酸の存在下または非存在下において複数のLAMP反応を行うことができる。例えば、複数のLAMP反応において、陰性対照は標的核酸を含んでいなくてもよい。このような実施形態のいくつかでは、阻害性オリゴヌクレオチドの活性を容易に観察することができ、例えば、標的核酸の非存在下かつ阻害性オリゴヌクレオチドの存在下でのLAMP反応における偽陽性増幅は、標的核酸も阻害性オリゴヌクレオチドも存在しない条件でのLAMP反応における偽陽性増幅よりも低減される。いくつかの実施形態において、この低減は、標的核酸の非存在下かつ阻害性オリゴヌクレオチドの存在下でのLAMP反応における偽陽性増幅の臨界時間(Ct)値が、標的核酸も阻害性オリゴヌクレオチドも存在しない条件でのLAMP反応における偽陽性増幅のCt値よりも増加することを含む。いくつかの実施形態において、Ct値の増加は、少なくとも2倍である。いくつかの実施形態では、Ct値の増加は、少なくとも3倍である。いくつかの実施形態において、前記増加は、少なくとも1分、2分、3分、4分、5分、6分、7分、8分、9分、10分、11分、12分、13分、14分、15分、16分、17分、18分、19分または20分である。

【0097】

いくつかの実施形態において、LAMP反応の増幅産物は、光信号、pH信号および電気信号から選択される信号の変化により検出される。いくつかの実施形態では、LAMP反応の増幅産物は、電気信号の変化により検出される。電気信号などを介してLAMP反応の増幅産物を容易に検出することができるシステム、方法および装置の例は、米国特許第9,506,908号；米国特許公開第2017/0114398号；米国特許公開第2016/0097742号；国際特許公開第WO/2016/057422号；および国際特許公開第WO/2018/057647号に開示されている(これらはの文献はいずれも引用によりその全体が明示的に援用される)。

【0098】

いくつかの実施形態では、正の信号閾値に達するのに要する時間を反映させるため、Ct値などの何らかの適用可能な統計学的方法を使用してデータの分析を行ってもよい。これらの値を使用して、参照試料中の別個の標的のそれぞれに対する導入した標的のコピー数の関数として検量線をプロットしてもよい。一致率の平均値および分散は、スチューデントのt検定を用いて有意性を評価してもよく、2回の反復実験および3回の反復実験(アッセイ内)ならびに独立した実験間(アッセイ間)での効果量ならびにp値および標準偏差を決定してもよい。

【0099】

特定のシステム

10

20

30

40

50

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、LAMP反応における標的核酸の検出用システムを含む。このようなシステムのいくつかは、本明細書で提供される、LAMP試薬ミックスを含む水溶液を収容する容器を含んでいてもよい。この容器は、LAMP試薬ミックスを収容するように構成された容器を含んでいてもよい。容器の例として、ウェル、チャンネル、流路、導管、プレートおよびチューブが挙げられる。これらの容器は、LAMP反応の実施に十分な温度にまでLAMP試薬を加熱するように構成された加熱源と接触させることができる。LAMP反応ミックスは、本明細書で提供される、標的核酸のLAMP反応を行うのに十分なLAMPプライマーセットと、本明細書で提供されるポリメラーゼと、本明細書で提供される阻害性オリゴヌクレオチドとを含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、試薬ミックスは、クラウディング剤を含んでいてもよい。クラウディング剤の例としては、ポリエチレングリコール(PEG)、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンおよびフィコールが挙げられる。

10

【0100】

いくつかの実施形態では、前記システムは、前記容器内の増幅産物を検出するように構成された検出器を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、検出器は、電気信号、pHまたは光信号の変化を検出するように構成されている。いくつかの実施形態では、検出器は、電気信号の変化を検出するように構成されている。電気信号などを介してLAMP増幅産物を容易に検出することができるシステム、方法および装置の例は、米国特許第9,506,908号；米国特許公開第2017/0114398号；米国特許公開第2016/0097742号；国際特許公開第WO/2016/057422号；および国際特許公開第WO/2018/057647号

20

【0101】

特定のキット

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、キットを含む。いくつかの実施形態において、このキットには、本明細書で提供する阻害性オリゴヌクレオチドと、LAMP反応を行うための少なくとも1種類の試薬とが含まれていてもよく、LAMP反応を行うための試薬としては、例えば、鎖置換活性を含むポリメラーゼ、および標的核酸のLAMP反応を行うのに十分なループ媒介等温増幅(LAMP)プライマーセットが挙げられる。いくつかの実施形態において、このキットは、本明細書で提供する水溶液を含んでいてもよい。

30

【0102】

また、いくつかの実施形態において、前記キットは、少なくとも第2の阻害性オリゴヌクレオチドを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、前記少なくとも第2の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~15のいずれかから選択される核酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の配列同一性、またはこれらのパーセンテージのいずれか2つを上下限とする範囲内の任意のパーセンテージの配列同一性を有する核酸を含んでいてもよく、このような核酸配列からなっているとしてもよく、または実質的にこのような核酸配列からなっているとしてもよい。いくつかの実施形態において、前記少なくとも第2の阻害性オリゴヌクレオチドは、配列番号1~15のいずれかから選択される配列を有する核酸の相補鎖にハイブリダイズすることができる核酸を含んでいてもよく、このような核酸配列からなっているとしてもよく、または実質的にこのような核酸配列からなっているとしてもよい。

40

【0103】

いくつかの実施形態において、配列番号1のヌクレオチド配列を有する阻害性オリゴヌクレオチドと、配列番号2のヌクレオチド配列を有する阻害性オリゴヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、LAMP試薬ミックス中の配列番号2の核酸配列を有する阻害性オリゴヌクレオチドと、配列番号1の核酸配列を有する阻害性オリゴヌクレオチドの比率は、1:10~1:1の範囲内である。いくつかの実施形態において、前記比率は1:5である。

50

【0104】

いくつかの実施形態において、前記キットは、複数の異なるLAMPプライマーセットをさらに含んでいてもよく、各LAMPプライマーセットは、それぞれ別の標的核酸のLAMP反応を行うのに十分である。いくつかの実施形態では、LAMPプライマーセットは、少なくとも4種のプライマーを含む。いくつかの実施形態では、LAMPプライマーセットは、少なくとも6種のプライマーを含む。いくつかの実施形態では、LAMPプライマーセットのプライマーは、配列番号19～156のいずれかから選択される核酸配列を含む。

【0105】

いくつかの実施形態において、前記ポリメラーゼは、Bstラージフラグメント、Bca(exo-)ポリメラーゼ、Ventポリメラーゼ、Vent(exo-)ポリメラーゼ、Deep Ventポリメラーゼ、Deep Vent(exo-)ポリメラーゼ、phi29ファージポリメラーゼ、MS-2ファージポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Z-Taqポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、クレノウ断片、Bst2.0ポリメラーゼ(NEB社)、Bst3.0ポリメラーゼ(NEB社)、Gspポリメラーゼ、Bst誘導体、Bsuポリメラーゼ、Sauポリメラーゼおよびこれらの任意の組み合わせから選択される。

10

【0106】

いくつかの実施形態において、前記試薬ミックスは、クラウディング剤を含む。いくつかの実施形態では、前記クラウディング剤は、ポリエチレングリコール(PEG)、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンおよびフィコールのうちの1種以上を含んでいてもよい。

20

【実施例】

【0107】

実施例1 - リン酸化および伸長したHAVFIP1バリエーションの活性

オリゴヌクレオチドであるHAVFIP1は、LAMP反応において非特異的増幅を阻害することが発見された。HCV標的の存在下でのHCV用LAMPプライマーセットを用いたLAMP法において、HAVFIP1のリン酸化バリエーションまたは伸長バリエーションが非特異的増幅を阻害する活性について試験した。HAVFIP1オリゴヌクレオチドの熱力学的モデリングにより、このオリゴヌクレオチドがその3'末端付近に、長い疑似二本鎖領域を有するヘアピン構造を形成していることが予測された(図1A)。この疑似二本鎖領域は、16塩基伸長することにより、図1Bに示す構造を得てもよい。この疑似二本鎖領域が伸長されたバリエーションを試験に使用した。試験したHAVFIP1バリエーションには、3'末端をリン酸化したHAVFIP1オリゴヌクレオチド、および3'末端を4塩基、8塩基、12塩基または16塩基伸長し、この伸長末端をリン酸化したHAVFIP1オリゴヌクレオチドを含めた。これらのバリエーションを表1に示す。

30

【表1】

オリゴヌクレオチド	配列番号
HAVFIP1	配列番号 1
HAVFIP1 Phos3'	配列番号 1
HAVFIP1_4b	配列番号 2
HAVFIP1_8b	配列番号 6
HAVFIP1_12b	配列番号 7
HAVFIP1_16b	配列番号 8

40

【0108】

50

WarmStart LAMPマスターミックス（ニュー・イングランド・バイオラボ、マサチューセッツ州イプスウィッチ）中で反応物を調製した。反応物には、20mM Tris-HCl（25 でpH8.8）、8mM 硫酸マグネシウム、50mM 塩化カリウム、10mM 硫酸アンモニウム、0.1% Tween-20、8U WarmStart Bst 2.0 DNAポリメラーゼ、7.5U WarmStart RTx逆転写酵素および5.6mM 各種dNTP混合物（各1.4mM）が含まれていた。さらに、追加の成分として、0.5U Antarctic Thermolabile UDG（NEB社）、0.7mM dUTP（ミリポアシグマ）、1×EvaGreenインターカレート色素（Biotium、カリフォルニア州フリーモント）およびプライマーセット「HCV Pr5」（FIP/BIP各40 μmol、LF/LB各10 μmolおよびF3/B3各5 μmolで構成される）を含めた。陽性試料は、HCV遺伝子型1型、2型および3型に由来する合成DNA配列の等モル混合物（「HCV Synth」；各配列につき 3.33×10^5 コピー/反応）を含有していた。陰性試料である「鋳型を含まない対照（NTC）」は、鋳型を含んでいなかった。表1に示す各HAVFIP1バリエーションを0 μM、2 μM、5 μMまたは10 μMの濃度で陽性試料および陰性試料に加えて試験した。各場合の総反応量は25 μLとした。LAMP反応は、Applied Biosystems社のQuantStudio 3（QS3）サーモサイクラーにおいて65 で120分間実行した。蛍光を毎分1回測定して、反応の進行を評価した。LAMPプライマーセットを含む標的核酸を表14～表19に示す。結果を表2にまとめる。「ニート」条件は、HAVFIP1バリエーションを含まない条件であり、各表に示した「FIP」は、試験対象のHAVFIP1バリエーションを指す。「増幅回数」は、前記試験条件で増幅が確認された反復回数を指す。鋳型を使用した各条件では3回の反復試験を行い、NTCではそれぞれ6回の反復試験を行った。

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

HAVFIP1 バリエント	試料名	Ct 平均値 (分)	Ct SD	Ct %RSD	増幅 回数
HAV FIP1	平均 HCV Synth ニート	16.51	0.18	1.08	
	HCV Synth + 2 μ M FIP	20.34	0.04	0.22	3
	HCV Synth + 5 μ M FIP	33.37	0.14	0.42	3
	HCV Synth + 10 μ M FIP	61.45	1.39	2.26	3
	平均 NTC ニート	42.69	1.32	3.08	
	NTC + 2 μ M FIP	96.85	12.07	12.47	4
	NTC + 5 μ M FIP				0
	NTC + 10 μ M FIP				0
HAV FIP1_4b ext_Phos3'	平均 HCV Synth ニート	16.51	0.18	1.08	
	HCV Synth + 2 μ M FIP	17.07	0.22	1.31	3
	HCV Synth + 5 μ M FIP	17.70	0.15	0.86	3
	HCV Synth + 10 μ M FIP	20.45	0.19	0.95	3
	平均 NTC ニート	42.69	1.32	3.08	
	NTC + 2 μ M FIP	71.49	18.76	26.24	5
	NTC + 5 μ M FIP	118.51			1
	NTC + 10 μ M FIP	76.59	16.33	21.32	2
HAV FIP1_12b ext_Phos3'	平均 HCV Synth ニート	16.51	0.18	1.08	
	HCV Synth + 2 μ M FIP	25.51	0.29	1.15	3
	HCV Synth + 5 μ M FIP	49.81	1.09	2.19	3
	HCV Synth + 10 μ M FIP	106.29	1.22	1.14	3
	平均 NTC ニート	42.69	1.32	3.08	
	NTC + 2 μ M FIP				0
	NTC + 5 μ M FIP				0
	NTC + 10 μ M FIP				0

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

HAVFIP1 バリエント	試料名	Ct 平均値 (分)	Ct SD	Ct %RSD	増幅 回数
HAV FIP1_Phos3'	平均 HCV Synth ニート	16.51	0.18	1.08	
	HCV Synth + 2 μ M FIP	16.06	0.12	0.73	3
	HCV Synth + 5 μ M FIP	16.07	0.26	1.59	3
	HCV Synth + 10 μ M FIP	16.08	0.18	1.11	3
	平均 NTC ニート	42.69	1.32	3.08	
	NTC + 2 μ M FIP	57.51	11.54	20.07	6
	NTC + 5 μ M FIP	74.70	22.32	29.87	6
	NTC + 10 μ M FIP	82.10	19.27	23.48	5
HAV FIP1_8b ext_Phos3'	平均 HCV Synth ニート	16.51	0.18	1.08	
	HCV Synth + 2 μ M FIP	102.12	2.19	2.14	3
	HCV Synth + 5 μ M FIP				0
	HCV Synth + 10 μ M FIP				0
	平均 NTC ニート	42.69	1.32	3.08	
	NTC + 2 μ M FIP				0
	NTC + 5 μ M FIP				0
	NTC + 10 μ M FIP				0
HAV FIP1_16b full ext_Phos3'	平均 HCV Synth ニート	16.51	0.18	1.08	
	HCV Synth + 2 μ M FIP	21.55	0.33	1.52	3
	HCV Synth + 5 μ M FIP	36.23	0.14	0.38	3
	HCV Synth + 10 μ M FIP	67.58	1.39	2.05	3
	平均 NTC ニート	42.69	1.32	3.08	
	NTC + 2 μ M FIP				0
	NTC + 5 μ M FIP				0
	NTC + 10 μ M FIP				0

10

20

30

40

【0109】

未修飾のHAVFIP1により、陽性増幅が直線的に遅延し、10 μ MのHAVFIP1を用いた反応では、FIP非含有試料を用いた場合の増幅と比べて約4倍の時間を要した。NTCでは、2 μ MのHAVFIP1を使用した場合に増幅速度が顕著に低下し、5 μ Mを超える濃度のHAVFIP1で増幅が完全に消失した。また、リン酸化HAVFIP1により、真の陽性増幅は遅延しなかったが、偽陽性増幅は阻害された。HAVFIP1_4bオリゴヌクレオチドでは、2 μ Mおよび5 μ Mの濃度で陽性増幅が緩やかに遅延することが観察されたが、10 μ MのHAVFIP1_4bを添加したところ、2 μ MのHAVFIP1を添加した場合の陽性の増幅時間とほぼ同等となった。いずれの場合でも、陰性増幅は遅延した。HAVFIP1_8bオリゴヌクレ

50

オチドでは、偽陽性増幅は観察されず、5 μ Mを超える濃度のHAVFIP1_8bにより陽性増幅が阻害された。HAVFIP1_12bオリゴヌクレオチドでは、未修飾HAVFIP1を使用した場合よりも陽性増幅が大幅に遅延し、すべての試験濃度においてNTCの増幅が完全に抑制された。HAVFIP1_16bオリゴヌクレオチドでは、増幅結果は未修飾HAVFIP1と非常に類似していた。ヘアピン構造の長さは、HAVFIP1バリエーションの活性に影響を及ぼした。注目すべきことに、リン酸化HAVFIP1により真の陽性増幅は遅延しなかったが、偽陽性増幅は阻害された。したがって、HAVFIP1およびHAVFIP1誘導体により、LAMP反応における非特異的増幅が抑制された。

【0110】

実施例2 - 短い伸長を有するHAVFIP1バリエーションの活性

短い伸長を有する様々なHAVFIP1バリエーションの活性を、HCV鋳型とHCV用LAMPプライマーセットを用いたLAMPアッセイで試験した。LAMPプライマーセットを表14～表19に示す。短い伸長を有するHAVFIP1バリエーションとして、3'末端がリン酸化されたHAVFIP1オリゴヌクレオチド、3'末端にリン酸化された1塩基伸長、2塩基伸長または3塩基伸長を有するHAVFIP1オリゴヌクレオチド、ヘアピン構造を有するHAVFIP1バリエーション、HAVFIP1前半部相補鎖バリエーションおよびHAVFIP1ヘアピンミラーバリエーションを使用した。これらのバリエーションを表3に示す。

【表3】

オリゴマー	ヘアピン構造の T _m (°C)	配列番号
HAVFIP1 Phos3'		配列番号 1
HAVFIP1_1b ext_Phos3'	60.7	配列番号 3
HAVFIP1_2b ext_Phos3'	62.4	配列番号 4
HAVFIP1_3b ext_Phos3'	63.5	配列番号 5
HAVFIP1_ヘアピン	53.7	配列番号 9
HAVFIP1_前半部相補鎖	48.1	配列番号 10
HAVFIP1_ヘアピンミラー	47.6	配列番号 18

【0111】

反応条件は、20mM Tris-HCl (25 でpH8.8)、8mM硫酸マグネシウム、50mM塩化カリウム、10mM硫酸アンモニウム、0.1% Tween-20、8U WarmStart Bst 2.0 DNAポリメラーゼ、7.5U WarmStart RTx逆転写酵素、5.6mM 各種dNTP混合物 (各1.4mM)、0.5U Antarctic Thermolabile UDG、0.7mM dUTP、1x EvaGreenインターカレート色素、およびプライマーセット「HCV Pr5」(FIP/BIP各40 μ mol、LF/LB各10 μ molおよびF3/B3各5 μ molで構成される)とした。陽性試料は「HCV Synth」混合物を含むものであり、NTCは鋳型を含まないものであった。表3に示した各HAVFIP1バリエーションは、10 μ Mの濃度で加えた。総反応量は25 μ Lとした。鋳型を含む反応物は3回の反復試験を行い、NTCは6回の反復試験を行った。LAMP反応は、Applied Biosystems社のQuantStudio 3 (QS3) サーマサイクラーにおいて65 で120分間実行した。LAMP反応を65 で120分間行い、蛍光を毎分1回測定した。結果を表4にまとめる。

10

20

30

40

50

【表 4】

試料名	Ct 平均値	Ct SD	%RSD	コメント
陽性ニート	17.1	0.5	2.7	
陰性ニート	46.1	11.8	25.6	6回の反復で増幅
陽性 + HAV FIP1_Phos3'	17.5	0.5	3.0	ニートと比較して +0.5 CT
陰性 + HAV FIP1_Phos3'	増幅なし			
陽性 + HAV FIP1_1b ext_Phos3'	18.0	0.2	1.2	ニートと比較して +1.0 CT
陰性 + HAV FIP1_1b ext_Phos3'	117.8		n/a	1回の反復で増幅
陽性 + HAV FIP1_2b ext_Phos3'	18.2	0.2	1.1	ニートと比較して +1.1 CT
陰性 + HAV FIP1_2b ext_Phos3'	増幅なし			
陽性 + HAV FIP1_3b ext_Phos3'	18.5	0.2	0.9	ニートと比較して +1.4 CT
陰性 + HAV FIP1_3b ext_Phos3'	94.6	23.0	24.3	3回の反復で増幅
陽性 + HAV FIP1_ヘアピン	17.8	0.3	1.8	ニートと比較して +0.7 CT
陰性 + HAV FIP1_ヘアピン	77.0	21.2	27.5	6回の反復で増幅
陽性 + HAV FIP1_前半部相補鎖	50.0	0.1	0.2	ニートと比較して +32.9 CT
陰性 + HAV FIP1_前半部相補鎖	増幅なし			
陽性 + HAV FIP1_ヘアピンミラー	17.8	0.3	1.9	ニートと比較して +0.7 CT
陰性 + HAV FIP1_ヘアピンミラー	33.4	4.4	13.1	6回の反復で増幅

10

20

30

【0112】

試験した各HAVFIP1バリエーションは、HAVFIP1_ヘアピンミラーを除いて、偽陽性増幅を低減する活性を有していた。HAVFIP1_Phos3'は、偽陽性増幅を完全に抑制し、真の陽性増幅はわずかにしか遅延しなかった。HAVFIP1を塩基単位で伸長したところ、付加する塩基の数が増加するほど、真の陽性増幅がより遅延した。HAVFIP1_3b ext_Phos3'バリエーションは、平均Ct値が約95分であるにもかかわらず、偽陽性試料の増幅が3回確認された。ヘアピン形成配列のみを含むHAVFIP1_ヘアピンバリエーションは、HAVFIP1_Phos3'バリエーションと比べてLAMP増幅の速度をより低下させるという効果のみが見られた。HAVFIP1_ヘアピンバリエーションは、ニート陰性と比べて統計学的に有意に陰性試料の増幅を遅延させた（ニートのCtは 46.1 ± 11.8 分であり、ヘアピンのCtは 77.0 ± 21.2 分であった； $p=0.014$ （両側t検定））。この結果から、このヘアピンセグメントが、偽陽性増幅を抑制する活性を十分に有することが示された。また、HAVFIP1_前半

40

50

部相補鎖バリエーションは、このヘアピン構造配列を保存しており、このヘアピン構造配列よりも前に位置するすべての塩基がその相補塩基になっているが、このHAVFIP1_前半部相補鎖バリエーションでは、真の陽性増幅の速度が約3分の1に低下し(50.0分に対して17.1分になり)、偽陽性増幅も完全に排除された。一方、天然のHAVFIP1により、HCV Pr5を用いたLAMP増幅の速度が約25%低下した。また、HAVFIP1_ヘアピンと相補的な塩基を有するが、逆相補鎖ではないHAVFIP1_ヘアピンミラーは、偽陽性増幅を増加させる。HAVFIP1_ヘアピンミラーにより、真の陽性増幅がわずかに遅延し、偽陽性増幅が加速した(ヘアピンミラーのCtは 33.4 ± 4.4 分であり、ニートのCtは 46.1 ± 11.8 分であった; 両側p値=0.048)。したがって、ヘアピン領域単独でも偽陽性増幅を抑制する活性を有していた。HAVFIP1のステムを伸長すると、偽陽性増幅の抑制が増強され、このステムをその相補鎖にすると、HAVFIP1配列はLAMPに対してより強力な阻害活性を示した。

10

【0113】

実施例3 - HAVFIP1濃度の影響

様々な濃度のリン酸化HAVFIP1(配列番号1)を用いてLAMP反応を行った。この反応には、HCV標的、HCV用LAMPプライマーセット、および様々な濃度のリン酸化HAVFIP1が含まれていた。最適化されたLAMP緩衝液中でBst 2.0 WARMSTART DNAポリメラーゼとWARMSTART RTx逆転写酵素を混合したLAMP WARMSTARTマスターミックス(ニュー・イングランド・バイオラボ、マサチューセッツ州イプスウィッチ)を使用して反応物を調製した。LAMPプライマーセットを表14~表19に示す。すべての反応を3回の反復で行った。陽性試料(「SCP HCV 2」および「DLS HCV 6」)は、HCVに感染したヒトから得た血漿であり、そのうちの $1.25 \mu\text{L}$ を各反応物に添加した。LAMP反応は、QS3サーモサイクラーにおいて65 で120分間実行した。蛍光を毎分1回測定して、反応の進行を評価した。表5に反応成分を示し、結果をまとめた。

20

30

40

50

【表 5】

標的	阻害性オリゴヌクレオチド	LAMP プライマー セット	Ct 平均値 (分)	Ct SD (分)	%RSD
SC P HCV 2	0 μM リン酸化 HAVFIP1	HCV O Pr 1	22.06	0.66	2.99
なし	0 μM リン酸化 HAVFIP1	HCV O Pr 1	47.94	7.71	16.09
SC P HCV 2	2 μM リン酸化 HAVFIP1	HCV O Pr 1	22.52	0.81	3.60
なし	2 μM リン酸化 HAVFIP1	HCV O Pr 1	62.20	12.94	20.80
SC P HCV 2	10 μM リン酸化 HAVFIP1	HCV O Pr 1	26.16	0.52	1.99
なし	10 μM リン酸化 HAVFIP1	HCV O Pr 1	86.06	-	-
DLS HCV 6	0 μM リン酸化 HAVFIP1	HCV Pr 5	11.19	0.07	0.59
なし	0 μM リン酸化 HAVFIP1	HCV Pr 5	48.78	5.31	10.88
DLS HCV 6	1 μM リン酸化 HAVFIP1	HCV Pr 5	11.23	0.07	0.64
なし	1 μM リン酸化 HAVFIP1	HCV Pr 5	54.10	8.45	15.62
DLS HCV 6	2 μM リン酸化 HAVFIP1	HCV Pr 5	11.58	0.03	0.27
なし	2 μM リン酸化 HAVFIP1	HCV Pr 5	65.12	14.74	22.63
DLS HCV 6	5 μM リン酸化 HAVFIP1	HCV Pr 5	11.76	0.16	1.33
なし	5 μM リン酸化 HAVFIP1	HCV Pr 5	105.65	11.00	10.41
DLS HCV 6	10 μM リン酸化 HAVFIP1	HCV Pr 5	12.44	0.05	0.37
なし	10 μM リン酸化 HAVFIP1	HCV Pr 5	-	-	-

10

20

30

【0114】

高濃度の10 μMリン酸化HAV FIPは、HCVの臨床試料の増幅に影響を及ぼさなかったが、標的の非存在下における鑄型を含まない対照（NTC）反応物の増幅を完全に阻害した。リン酸化HAV FIPの濃度が増加するほど、NTCのCt値が上昇した。標的の存在下におけるHCV LAMP反応の場合、リン酸化HAVFIP1が反応に含まれていても実質的な影響は認められなかった。一方、NTCの反応では、HCV LAMP反応中にリン酸化HAVHIP1が含まれていることによってCt値が上昇し、リン酸化HAVFIP1の濃度が上昇するほどCt値が上昇した。したがって、リン酸化HAVFIP1は、濃度依存的にLAMP反応における非特異的増幅を阻害した。

40

【0115】

実施例4 - LAMPにおける別の阻害性オリゴマーの活性

様々なオリゴヌクレオチドがLAMP反応において非特異的増幅を阻害する活性を有するかどうかを試験した。反応物は、HCV用LAMPプライマー（HCV Pr5）と様々な試験用オリゴヌクレオチドを含み、標的核酸を含んでいなかった。最適化されたLAMP緩衝液中でBst 2.0 WARMSTART DNAポリメラーゼとWARMSTART RTx逆転写酵素を混合したLAMP WARMSTARTマスターミックス（ニュー・イングランド・バイオラボ、マサチ

50

ューセット州イプスウィッチ)を使用して反応物を調製した。試験用オリゴヌクレオチドは、2 μ Mの濃度で試験した。LAMPプライマーセットを表14～表19に示す。反応を6回の反復で行った。ニート試料は試験用オリゴヌクレオチドを含まなかった。LAMP反応は、QS3サーモサイクラーにおいて65 で120分間実行した。蛍光を毎分1回測定して、反応の進行を評価した。表6に試験用オリゴヌクレオチドを示す。結果を表7にまとめる。

【表6】

オリゴヌクレオチド	Tm (°C)	配列番号
HAVFIP1	53.7	配列番号 1
HAVBIP1	60.6	配列番号 97
Dev3 BIP	52.7	配列番号 15
Dev3 BIP_4b ext	64.8	配列番号 11
Dev3 BIP_17b full ext	92	配列番号 12
HAVFIP1_2b cut	47.1	配列番号 17
HAVFIP1_4b cut	43.1	配列番号 13
RSV Pr1 FIP	50.6	配列番号 85
RSV Pr2 FIP	53.2	配列番号 14
TB Pr2 BIP	50.5	配列番号 16
TB Pr3 BIP	53.2	配列番号 111

10

20

30

40

50

【表 7】

試料	Ct 平均値	Ct SD	%RSD	増幅が 確認された 反復数	ニートと 比較したΔCt	両側 p 値
ニート	44.9	3.3	7.3	6	n/a	
HAVFIP1	75.7		n/a	1	+30.7	強い
HAVBIP1	41.1	3.3	8.0	6	-3.8	>0.05
Dev3 BIP	61.0	6.2	10.1	6	+16.1	<0.05
Dev3 BIP 4b ext	70.0		n/a	1	+25.1	強い
Dev3 BIP 17b full ext	増幅なし					強い
HAVFIP1 2b cut	47.7	18.5	38.8	5	+2.8	>0.05
HAVFIP1 4b cut	92.6	6.4	6.9	4	+47.6	<0.01
RSV Pr1 FIP	49.0	13.6	27.6	6	+4.1	>0.05
RSV Pr2 FIP	106.5		n/a	1	+61.5	強い
TB Pr2 BIP	47.4	8.9	18.8	6	+2.5	>0.05
TB Pr3 BIP	52.9	4.0	7.7	6	+7.9	<0.01
<p>ニートと比較したΔCt：該当の条件での平均 Ct 値とニート試料（陰性対照）の平均 Ct 値の差に関し、陽性はニートよりも遅く、陰性はニートよりも速いことを示す。</p> <p>両側 p 値：該当の試料とニートの間における両側 t 検定の結果に関する。p 値>0.05 のものは、ニートと統計学的有意差がないことを示す。p 値<0.05 のものは、統計学的有意差に達したことを示す。「強い」で示したものは極めて有意な効果（増幅なしの反復および微量の増幅／非常に遅い増幅）があったことを示し、t 検定を実施しなかった。</p>						

【0116】

特定のオリゴヌクレオチドの予測される二次構造を図 2 に示す。Dev3 BIP_4b ext、Dev3 BIP_17b full ext および RSV Pr2 FIP の各オリゴマーは、HAVFIP1 と同様に、LAMP 増幅反応の鑄型を含まない対照において偽陽性に対する強力な抑制活性を有していた。また、Dev3 BIP、HAVFIP1_4b cut および TB Pr3 BIP の各オリゴマーは、LAMP 増幅反応の鑄型を含まない対照において、陰性対照（ニート）と比べて、偽陽性に対してある程度の抑制活性を有していたが、偽陽性の非特異的増幅の排除や劇的な遅延も認められなかった。また、HAV BIP1、HAVFIP1_2b cut および TB Pr2 BIP の各オリゴマーは、LAMP 増幅反応の鑄型を含まない対照において、偽陽性に対する抑制活性を実質的に有しておらず、陰性対照（ニート）と同程度の結果を示した。

【0117】

実施例 5 - 特定の LAMP プライマーセットを用いた HAVFIP1 バリエーションの活性

リン酸化された 3' 末端を有する HAVFIP1 オリゴヌクレオチド（配列番号 1）と、リン酸化された 4 塩基伸長を 3' 末端に有する HAVFIP1 オリゴヌクレオチドバリエーション（配列番号 2）とを含む HAVFIP1 バリエーションの混合物の活性を、様々な LAMP プライマーセットを用いた LAMP アッセイで試験した。この様々な LAMP プライマーセットとして、 Deng 熱 Pr1； Deng 熱 Pr2； HCV Pr4； HCV Pr6； ジカ Pr1； および ジカ Pr3 の各プライマーセットを使用した。各 LAMP プライマーセットを表 14～表 19 に示す。各 LAMP プ

ライマーセットは、LAMP反応の初期（約30～40分）にNTCの増幅を示した。WarmStart LAMPマスターミックスを使用して、すべての試料に対して8回分の反復試料を調製した。LAMP反応は、QS3サーモサイクラーにおいて65℃で120分間実行した。蛍光を毎分1回測定して、反応の進行を評価した。10μMのHAVFIP1_4b_ext_Phos3'と50μMのHAVFIP1_Phos3'を含むHAVFIP1バリエーションの混合物（「FLASH」）を作製し、HAVFIP1_4b_ext_Phos3'の最終濃度が2μMとなり、かつHAVFIP1_Phos3'の最終濃度が10μMとなるように反応物に添加した。鋳型を含む反応物は使用しなかった。結果を表8にまとめる。

【表8】

試料	Ct 平均値	Ct SD	%RS	最も初期の 増幅 (Ct)	増幅が確認 された反復数
デング熱 Pr1 ニート	31.40	2.08	6.64	29.35	8
デング熱 Pr1 + FLASH	105.85	16.92	15.98	93.88	2
デング熱 Pr2 ニート	36.72	10.40	28.32	30.85	8
デング熱 Pr2 + FLASH	84.21	20.66	24.53	60.46	5
HCV Pr4 ニート	54.83	8.34	15.21	44.28	8
HCV Pr4 + FLASH	増幅なし				
HCV Pr6 ニート	76.76	10.88	14.18	69.07	2
HCV Pr6 + FLASH	増幅なし				
ジカ Pr1 ニート	48.06	3.27	6.81	41.63	8
ジカ Pr1 + FLASH	77.90	13.56	17.40	58.63	5
ジカ Pr3 ニート	77.85	22.29	28.63	55.88	5
ジカ Pr3 + FLASH	増幅なし				

【0118】

HAVFIP1バリエーションの混合物は、いずれのLAMPプライマーセットを含む反応物に対しても顕著な効果を有していた。HCV Pr4ニートの8回の反復では、いずれも平均Ct値が約55分で増幅されたが、HAVFIP1バリエーションの混合物を添加した場合、増幅は認められなかった。また、HAVFIP1バリエーションの混合物の添加により、ジカPr3およびHCV Pr6の反復において増幅が阻止された。HAVFIP1バリエーションの混合物は、ジカPr1 LAMPプライマーセットを含むLAMP反応物に対する効果が低く（平均Ct値は、ニートで約48分であり、HAVFIP1バリエーションの混合物で78分であった）、デング熱Pr2 LAMPプライマーセットを含むLAMP反応物に対する効果も低かった（平均Ct値は、ニートで約37分、HAVFIP1バリエーション混合物で約84分であった）。

【0119】

実施例6 - 特定のLAMPプライマーセットを用いた標的の増幅

この実施例では、標的に対するLAMPプライマーセットを含む15種のLAMPプライマーセットの混合物を用いた標的のLAMP増幅について説明する。各混合物は、HAVFIP1を含んでいた。標的として、Synt RSV、Syntジカ、Vircell社デング熱、Synt HAV、S

10

20

30

40

50

ynt HBV、Synt HCVミックス、Synt HIVミックス、Syntパルボ、ATCC FluA、ATCC Sal、Synt TB_3、Synt H inf、Synt Dev2、MS2およびSyntマラリアを使用した。また、LAMPプライマーとして、RSVプライマー_new LB、ジカ_2プライマー、デング熱_1プライマー、HAVプライマー、HBVプライマー、HCV pr5、HIVプライマー1、パルボプライマー、Sal_2プライマー、TB_3プライマー、H infプライマー、Dev2プライマー、MS2プライマー、自家製マラリアプライマー180123、FluAH3N1_5プライマーの15種のLAMPプライマーセットを混合した。例えば、Kim DW, et al., J Clin Microbiol (2011) 49:3621-3626およびChander Y, et al., Front Microbiol (2014) 5:395を参照されたい(これらの文献は引用によりその全体が本明細書に援用される)。LAMPプライマーセットを表14～表19に示す。この実験では、HAVプライマーミックスにHAVFIP1(配列番号1)を1.6 μMの濃度で添加した。

10

【0120】

各反応物につき、15種のLAMPプライマーセットを含むプライマーミックス3 μLをマスターミックスに添加することによって反応物を調製した。WarmStartマスターミックスを使用して、各標的に対し4回の反復試料を別々のチューブに調製した。言い換えれば、各チューブには異なる標的が含まれていた。また、NTC反応を8回行った。各合成反応には 10^6 コピーの標的が含まれていた。ATCC Sal反応物には 4.8×10^5 コピーの標的が含まれ、ATCC FluA(H3N2)試料には 4.24×10^7 コピーの標的が含まれていた。LAMP反応は、QS3サーモサイクラーにおいて65 で120分間実行した。蛍光を毎分1回測定して、反応の進行を評価した。結果を表9にまとめる。

20

30

40

50

【表 9】

試料	Ct 平均値	Ct SD	%RSD
Synt RSV	28.88	0.17	0.58
Synt ジカ	19.00	0.06	0.31
Vircell 社デング熱	-	-	-
Synt HAV	44.00	0.24	0.55
Synt HBV	27.32	0.28	1.04
Synt HCV	29.28	0.36	1.22
Synt HIV	30.71	0.05	0.16
Synt パルボ	39.89	0.55	1.37
ATCC Sal	44.83	0.28	0.62
Synt TB	30.52	0.05	0.15
Synt H Inf	57.38	0.18	0.32
Synt Dev2	30.01	0.52	1.74
MS2	17.38	0.19	1.08
Synt マラリア	41.10	0.09	0.23
ATCC FluA	65.85	0.39	0.59
すべてのプライマー による NTC	-	-	-

10

20

30

40

【0121】

15種のLAMPプライマーセットを含むプライマーミックスにより、Vircell社のデング熱を除く、すべての陽性反応物が増幅した。NTC反応物はいずれも増幅しなかった。この結果から、HAVFIP1が反応に含まれていれば、高度に多重化された特異的なLAMPを実施可能であることが示された。

【0122】

実施例7 - LAMP法を増強するためのPEGの使用

LAMPの結果を得るまでに要する時間と感度を改善するために、Bst 2.0と5%ポリエチレングリコール-35k (PEG) を添加した場合と、これらを添加しなかった場合を試験し

50

た。過去の実験では、PEGを5%添加した反復試験では、PEGを添加しなかった反復試験よりも早期に増幅した。WarmStart LAMPマスターミックスを使用して反応物を調製し、いずれの反応物もRSV A_B 4プライマーを含んでいた。試験条件は、5%のPEGと追加の+3 μ LのBst 2.0を含むLAMPミックス、5%のPEGと+0 μ LのBst2.0を含むLAMPミックス、0%のPEGと+3 μ LのBst2.0を含むLAMPミックス、および0%のPEGと+0 μ LのBst2.0を含むLAMPミックス（LAMP対照）とした。LAMPプライマーセットを表14～表19に示す。鑄型としてRSV AB Megamerを、各反応につき 10^6 コピー、 10^4 コピー、 10^2 コピー、1コピーおよび0コピー（NTC）（C/反応）添加した。LAMP反応は、QS3サーモサイクラーにおいて65 で120分間実行した。蛍光を毎分1回測定して、反応の進行を評価した。結果を表10にまとめる。

10

20

30

40

50

【表 1 0】

添加剤	RSV AB Megamer の濃度 (コピー/反応)	Ct 平均値 (分)	Ct SD (分)	%RSD	増幅が 確認された 反復数
5% PEG; +3 μ L Bst 2.0	10^6	7.28	0.09	1.30	4/4
	10^4	9.45	0.23	2.47	4/4
	10^2	30.53	20.12	65.89	4/4
	1	50.98	10.00	19.61	4/4
	NTC	46.54	12.83	27.56	4/4
0% PEG; +3 μ L Bst 2.0	10^6	8.86	0.06	0.63	4/4
	10^4	10.81	0.17	1.55	4/4
	10^2	40.19	24.72	61.49	4/4
	1	61.30	21.89	35.71	3/4
	NTC	77.17	2.31	2.99	2/4
5% PEG; +0 μ L Bst 2.0	10^6	7.86	0.05	0.62	4/4
	10^4	9.82	0.29	2.96	4/4
	10^2	21.05	14.58	69.27	4/4
	1	35.58	5.79	16.28	4/4
	NTC	60.33	17.18	28.47	4/4
0% PEG; +0 μ L Bst 2.0 (LAMP 対照)	10^6	13.53	0.11	0.81	4/4
	10^4	16.36	0.28	1.69	4/4
	10^2	34.65	15.91	45.92	4/4
	1	45.17	8.54	18.90	4/4
	NTC	46.86	3.28	7.00	4/4

10

20

30

40

【 0 1 2 3】

すべての値をGrubbsの検定で評価し、外れ値があるかどうかを判定した。外れ値を有するものについては、アスタリスク(*)で印を付け、外れ値を除外して平均Ct値および標準偏差を再計算した。3 μ LのBst 2.0を添加すると、Ct値は低下したが、低いコピー数の検出は改善されなかった。5%のPEGと+3 μ LのBst 2.0を含む反復試験では、全体的に最も早いCt値が得られたが、わずか5%のPEGを含む反復試験よりもわずかに速いだけであった。

【 0 1 2 4】

実施例 8 - LAMP法を増強するための様々なクラウディング剤の使用

50

様々なクラウディング剤を使用してRSV AB Megamerのダイナミックレンジを試験することにより、低いコピー数を検出できるかどうかを確認した。試験条件は、5%のPEG-35K、5%のPEG-8K、または5%のフィコール-400Kとした。RSV AB Megamerを10倍段階希釈して 10^6 コピー/反応～0コピー/反応の濃度に調製し、各条件を試験した。各条件とも3回の反復で試験した。LAMPプライマーセットを表14～表19に示す。LAMP反応は、QS3サーモサイクラーにおいて65℃で120分間実行した。蛍光を毎分1回測定して、反応の進行を評価した。結果を表11にまとめる。

【表11】

クラウディング剤	RSV AB Megamer の濃度(コピー/反応)	Ct 平均値 (分)	Ct SD (分)	%RSD	増幅が 確認された 反復数
5% PEG-35K	10^6	8.895	0.007	0.079	3/3
	10^5	10.211	0.272	2.665	3/3
	10^4	12.600	0.484	3.845	3/3
	10^3	15.538	1.509	9.710	3/3
	10^2	25.619	9.875	38.546	3/3
	10	25.535	1.468	5.749	3/3
	1*	46.293	0.129	0.278	3/3
	NTC	37.918	8.597	22.673	3/3
5% PEG-8K	10^6	8.094	0.072	0.893	3/3
	10^5	9.642	0.071	0.734	3/3
	10^4	11.479	0.220	1.916	3/3
	10^3	15.326	2.981	19.449	3/3
	10^2	23.416	8.041	34.340	3/3
	10	30.666	1.433	4.672	3/3
	1	38.658	5.012	12.965	3/3
	NTC	32.033	1.490	4.651	2/3
5% フィコール- 400K	10^6	10.015	0.110	1.096	3/3
	10^5	11.748	0.066	0.562	3/3
	10^4	13.431	0.376	2.803	3/3
	10^3	16.152	2.494	15.442	3/3
	10^2	18.180	2.986	16.423	2/3
	10	増幅なし			0/3
	1	増幅なし			0/3
	NTC	増幅なし			0/3

【0125】

すべての値をGrubbsの検定で評価し、外れ値があるかどうかを判定した。外れ値を有す

10

20

30

40

50

るものについては、アスタリスク(*)で印を付け、外れ値を除外して平均Ct値および標準偏差を再計算した。図3は、様々なクラウディング剤を含む反応において様々な濃度の標的に対するCt値をまとめたグラフである。5%のPEG-8Kは、全体的に最も早いCt値が得られたが、低い方から3つの濃度においてNTCでの増幅と同様の結果であった。5%のフィコール-400KではNTCを設けなかったが、反応あたり10コピーまたは1コピーの濃度では検出できなかった。

【0126】

実施例9 - 阻害性オリゴヌクレオチドおよびクラウディング剤を用いたLAMP法

試料中に汎用輸送用培地(UTM)を入れた条件、または試料中に汎用輸送用培地(UTM)を入れなかった条件で、様々な標的に対する阻害性オリゴヌクレオチド(リン酸化FIPノリン酸化FIP4)とPEG-35Kの混合物の効果を評価した。この阻害性オリゴヌクレオチド混合物は、リン酸化された3'末端を有するHAVFIP1オリゴヌクレオチド(リン酸化FIP; 配列番号1)と、リン酸化された4塩基伸長を3'末端に有するHAVFIP1オリゴヌクレオチドバリエーション(リン酸化FIP4; 配列番号2)とを含むHAVFIP1バリエーションの混合物であった。標的として、合成(Synt)HIV 1C、Synt HCV 1、RSV AB MegamerまたはFluA_M2_180815_2を使用した。LAMPプライマーセットとして、HIV 1プライマー、HCV 10プライマー、RSV A_B 4プライマーまたはFluA_180817_H3N2_2/3を使用した。LAMPプライマーセットの例を表14~表19に示す。

【0127】

試験条件は、HAVFIP1バリエーションの存在下でのSynt HCV 1; HAVFIP1バリエーションの非存在下でのSynt HCV 1; HAVFIP1バリエーションの存在下かつUTMの非存在下でのFluA_M2_180815_2; HAVFIP1バリエーションの非存在下かつUTMの非存在下でのFluA_M2_180815_2; HAVFIP1バリエーションおよびUTMの存在下でのFluA_M2_180815_2; HAVFIP1バリエーションの非存在下かつUTMの存在下でのFluA_M2_180815_2; HAVFIP1バリエーションの存在下かつUTMの非存在下でのRSV AB Megamer; HAVFIP1バリエーションの非存在下かつUTMの非存在下でのRSV AB Megamer; HAVFIP1バリエーションおよびUTMの存在下でのRSV AB Megamer; HAVFIP1の非存在下かつUTMの存在下でのRSV AB Megamer; HAVFIP1バリエーションの存在下でのSynt HIV 1C; ならびにHAVFIP1バリエーションの非存在下でのSynt HIV 1Cとした。WarmStart LAMPマスターミックスを使用して、10⁴コピー/反応の濃度の標的またはNTCを試験した。各条件とも3回の複製で試験した。HAVFIP1バリエーションの濃度は、リン酸化FIPは10 μMとし、リン酸化FIP4は1 μMとした。LAMP反応は、QS3サーモサイクラーにおいて65で120分間実行した。蛍光を毎分1回測定して、反応の進行を評価した。結果を表12Aにまとめる。

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 12A

プライマー	HAVFIP1 バリエーション	標的の濃度 (コピー/反応)	Ct 平均値 (分)	Ct SD (分)	%RSD	増幅が 確認された 反復数
HCV	あり	10 ⁴	18.67	0.79	4.25	3/3
		NTC	28.80	3.22	11.19	3/3
	なし	10 ⁴	17.04	1.67	9.78	3/3
		NTC	20.90	0.56	2.69	3/3
UTMの 非存在下での FluA	あり	10 ⁴	31.49	0.09	0.27	3/3
		NTC	47.38			1/3
	なし	10 ⁴	27.44	1.95	7.10	3/3
		NTC	47.88	5.93	12.38	3/3
UTMの 存在下での FluA	あり	10 ⁴	34.10	0.49	1.44	3/3
		NTC	増幅なし			0/3
	なし	10 ⁴	25.06	3.06	12.23	3/3
		NTC	47.11	13.22	28.06	1/3
UTMの 非存在下での RSV	あり	10 ⁴	12.85	0.40	3.10	3/3
		NTC	増幅なし			0/3
	なし	10 ⁴	11.23	0.26	2.36	3/3
		NTC	45.38	5.70	12.57	3/3
UTMの 存在下での RSV	あり	10 ⁴	13.84	0.10	0.72	3/3
		NTC	増幅なし			0/3
	なし	10 ⁴	11.80	0.23	1.99	3/3
		NTC	53.27	4.77	8.95	2/3
HIV	あり	10 ⁴	53.49			1/3
		NTC	56.65			1/3
	なし	10 ⁴	25.35	1.99	7.84	3/3
		NTC	26.68	2.24	8.39	3/3

10

20

30

40

【0128】

阻害性オリゴヌクレオチドの混合物（リン酸化FIP/リン酸化FIP4）は、PEG-35Kと併せて使用した場合に、NTCの抑制に効果的であった。

【0129】

特定の配列

様々な配列を以下の表に示す。表13は、LAMP増幅反応中の非特異的増幅に対する阻害活性について試験した様々なオリゴヌクレオチドを示す。表14～表19は、表に示した特定の病原体から得た核酸の検出用のLAMPプライマーセットを示しており、各LAMPプライマーセットにはF3、B3、FIP、BIP、LFおよびLBが含まれる。具体的には、表14は

50

、各LAMPプライマーセットのF3プライマーを示しており、表15は各LAMPプライマーセットのB3プライマーを示しており、表16は各LAMPプライマーセットのFIPプライマーを示しており、表17は各LAMPプライマーセットのBIPプライマーを示しており、表18は各LAMPプライマーセットのLFプライマーを示しており、表19は各LAMPプライマーセットのLBプライマーを示している。

【表13】

オリゴヌクレオチド	配列番号	配列
HAVFIP1	配列番号 1	CGTAGCCTACCCCTTGTGGAAGGTTTGG AACGT CACCTTGCA
# HAVFIP1_4b ext_Phos3' (別名:リン酸化 FIP4)	配列番号 2	CGTAGCCTACCCCTTGTGGAAGGTTTGG AACGT CACCTTGCAACAAG
# HAVFIP1_1b ext Phos3'	配列番号 3	CGTAGCCTACCCCTTGTGGAAGGTTTGG AACGT CACCTTGCAC
# HAVFIP1_2b ext_Phos3'	配列番号 4	CGTAGCCTACCCCTTGTGGAAGGTTTGG AACGT CACCTTGCAACA
# HAVFIP1_3b ext_Phos3'	配列番号 5	CGTAGCCTACCCCTTGTGGAAGGTTTGG AACGT CACCTTGCAACAA
# HAVFIP1_8b ext_Phos3' (別名:リン酸化 FIP8)	配列番号 6	CGTAGCCTACCCCTTGTGGAAGGTTTGG AACGT CACCTTGCAACAAGGGGT
# HAVFIP1_12b ext_Phos3' (別名:リン酸化 FIP12)	配列番号 7	CGTAGCCTACCCCTTGTGGAAGGTTTGG AACGT CACCTTGCAACAAGGGGTAGGC
# HAVFIP1_16b full ext_Phos3' (別名:リン酸化 FIP16)	配列番号 8	CGTAGCCTACCCCTTGTGGAAGGTTTGG AACGT CACCTTGCAACAAGGGGTAGGCTACG
HAVFIP1_ヘアピン	配列番号 9	TGGAAGGTTTGG AACGTCACCTTGCA
HAVFIP1_前半部相補鎖	配列番号 10	GCATCGGATGGGGAAGTGG AACGTTTGG AACGT CACCTTGCA
Dev3 BIP_4b ext	配列番号 11	GGCAAGTGGCAGCCCAAACGGAGCCCCCAGCAT CGTTTGG
Dev3 BIP_17b full ext	配列番号 12	GGCAAGTGGCAGCCCAAACGGAGCCCCCAGCAT CGTTTGGGCTGCCACTTGCC
HAVFIP1_4b cut	配列番号 13	CGTAGCCTACCCCTTGTGGAAGGTTTGG AACGT CACCT
RSV Pr2 FIP	配列番号 14	TAATGATGCTTTTGGGTTGTTCAATGTTTATGAAT ATGCCCAAAAATTGG
Dev3 BIP	配列番号 15	GGCAAGTGGCAGCCCAAACGGAGCCCCCAGCAT CGT
TB Pr2 BIP	配列番号 16	TCTACCAGTACTGCGGCGACGTTCTCTGGCGTT GAGCGTAG
HAVFIP1_2b cut	配列番号 17	CGTAGCCTACCCCTTGTGGAAGGTTTGG AACGT CACCTTG
HAVFIP1 ヘアピンミラー	配列番号 18	ACCTTCCAAACCTTGCAAGTGG AACGT
# 3'末端がリン酸化されたオリゴマー		

10

20

30

40

50

【表 1 4】

F3 プライマー		
プライマーセット (病原体)	配列番号	配列
デング熱 Pr1 (デング熱ウイルス)	配列番号 19	TCTCTGATGAACAACCAACG
デング熱 Pr2 (デング熱ウイルス)	配列番号 20	GACCGTCTTTCAATATGCTG
Dev2 プライマー (人工)	配列番号 21	CGTGTTTGCTCTCACGAA
FluAH3N1_5 プライマー (A 型インフルエンザウイルス, H3N1 株)	配列番号 22	CTATCRTCCCGTCAGGC
FluA_180817_H3N2_2/3 (A 型インフルエンザウイルス, H3N2 株)	配列番号 23	TGAAAATTTGCAGACCTATCAGAA
H inf プライマー (インフルエンザ菌)	配列番号 24	CGCCAATACATTCAACAAGA
HAV プライマー (A 型肝炎ウイルス)	配列番号 25	GCATGGAGCTGTAGGAGTCT
HBV プライマー (B 型肝炎ウイルス)	配列番号 26	TCCTCACAATACCGCAGAGT
HCV O Pr1 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 27	ATGAGTGTTCGTGCAGCCT
HCV Pr4 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 28	CGCAGAAAGCGTCTAGCC
HCV Pr5 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 29	GTATGAGTGTTCGTGCAGCC
HCV Pr6 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 30	CGGGAGAGCCATAGTGGTC
HCV 10 プライマー (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 31	GTATGAGTGTTCGTGCAGCC
HIV プライマー1 (ヒト免疫不全ウイルス 1 型)	配列番号 32	GGTTTATTACAGGGACAGCA
マラリアプライマー (プラスモジウム属のすべての種)	配列番号 33	CATGTCGTCTCATCGCAG
MS2 プライマー (バクテリオファージ MS2)	配列番号 34	TGTCATGGGATCCGGATGTT
パルボプライマー (パルボウイルス B19)	配列番号 35	TGGACAGTTATCTGACCAC
RSV A_B 4 プライマー (RS ウイルス)	配列番号 36	TTATGTTAGGACACGCTAGT
RSV Pr1 (RS ウイルス)	配列番号 37	TGTTTATGAATGCCTATGGTG
Sal_2 プライマー (サルモネラ・テ ィフィウム, LT2 株)	配列番号 38	GCGAAGCGTACTGGAAAGG
TB_3 プライマー (ヒト型結核菌)	配列番号 39	TCACCTATGTGTGCACCTGG
ジカ Pr1 (ジカウイルス)	配列番号 40	AGAGCAGGCCTTGCTACT
ジカ_2 (ジカウイルス)	配列番号 41	GCGACCTGATGGTTCTCATC
ジカ Pr3 (ジカウイルス)	配列番号 42	GCGACCTGATGGTTCTCATC

10

20

30

40

50

【表 1 5】

B3 プライマー		
プライマーセット (病原体)	配列番号	配列
デング熱 Pr1 (デング熱ウイルス)	配列番号 43	CTTCTTGAATGAGCCCCAT
デング熱 Pr2 (デング熱ウイルス)	配列番号 44	TTCTTGAATGAGCCCCAT
Dev2 プライマー (人工)	配列番号 45	CGGAAGTTTTCCGCCAAT
FluAH3N1_5 プライマー (A 型インフルエンザウイルス, H3N1 株)	配列番号 46	CCATTCCCATTNAGGGCATT
FluA_180817_H3N2_2/3 (A 型インフルエンザウイルス, H3N2 株)	配列番号 47	ACTCTATGCTGACAAAATGATT
H inf プライマー (インフルエンザ菌)	配列番号 48	CGTATGGGGTTTGTGCA
HAV プライマー (A 型肝炎ウイルス)	配列番号 49	TCCACTGGATGAGAGTCAGT
HBV プライマー (B 型肝炎ウイルス)	配列番号 50	GCATAGCAGCAGGATGAAGA
HCV O Pr1 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 51	CACGGTCTACGAGACCTCC
HCV Pr4 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 52	CAGGCAGTACCACAAGGC
HCV Pr5 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 53	ACCCTATCAGGCAGTACCAC
HCV Pr6 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 54	CACGGTCTACGAGACCTCC
HCV 10 プライマー (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 55	CACGGTCTACGAGACCTCC
HIV プライマー-1 (ヒト免疫不全ウイルス 1 型)	配列番号 56	ATCCTGTCTACTTGCCACA
マラリアプライマー (プラスモジウム属のすべての種)	配列番号 57	TGGTAATAGGGCTTAAACCAA
MS2 プライマー (バクテリオファージ MS2)	配列番号 58	CAATAGAGCCGCTCTCAGAG
パルボプライマー (パルボウイルス B19)	配列番号 59	CATGAATCCTTGCAGCAC
RSV A_B 4 プライマー (RS ウイルス)	配列番号 60	TCTTGATTCTTGGTGTACC
RSV Pr1 (RS ウイルス)	配列番号 61	GTGAGGAAATTGAGTCAAAGA
Sal_2 プライマー (サルモネラ・ティフィムリウム, LT2 株)	配列番号 62	TCAACAATGCGGGGATCTG
TB_3 プライマー (ヒト型結核菌)	配列番号 63	CCGGATCGATGTGTACTGAG
ジカ Pr1 (ジカウイルス)	配列番号 64	AGCCAATGCGCATATCAGG
ジカ_2 (ジカウイルス)	配列番号 65	CAGGGCCATGACAAATGGT
ジカ Pr3 (ジカウイルス)	配列番号 66	CAGGGCCATGACAAATGGT

10

20

30

40

50

【表 16 - 1】

FIP プライマー		
プライマーセット (病原体)	配列番号	配列
デング熱 Pr1 (デング熱ウイルス)	配列番号 67	CTCTTCGCCAACTGTGAAACAGTCGACCGTC TTTCAATATGC
デング熱 Pr2 (デング熱ウイルス)	配列番号 68	CTCTTCGCCAACTGTGAAACAAAACGCGCGA GAAACCG
Dev2 プライマー (人工)	配列番号 69	ACGTAGATCCGTTCCGTTGAAGTTGACCTGG AGATCAAGGA
FluAH3N1_5 プライマー (A 型インフルエンザウイルス, H3N1 株)	配列番号 70	TAGCCATTCCATGAGNGCCTCACCCCTCAA GCCGAGAT
FluA_180817_H3N2_2/3 (A 型インフルエンザウイルス, H3N2 株)	配列番号 71	AAGTGCAAGATCCCAATGATATTGCAGATGC AACGATTCAAGT
H inf プライマー (インフルエンザ菌)	配列番号 72	ACTTCTTTACCAAAGGCATCATTTTGCCTTTG TTGACGCCAAATTCTGG
HAV プライマー (A 型肝炎ウイルス)	配列番号 73	CGTAGCCTACCCCTTGTGGAAGGTTTGAAC GTCACCTTGCA
HBV プライマー (B 型肝炎ウイルス)	配列番号 74	GTTGGGGACTGCGAATTTTGGCTCGTGGTG GACTTCTCTCAA
HCV O Pr1 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 75	ATCCAAGAAAGGACCCGGTCGTCGGGAGAG CCATAGTGGT
HCV Pr4 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 76	GGTTCGCGAGACCACTATGGCATGAGTGTC GTGCAGCCT
HCV Pr5 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 77	CAAGAAAGGACCCGGTCGTCGGGAGAGC CATAGTGGT
HCV Pr6 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 78	GCCCAAATCTCCAGGCATTGAGCGGAACCG GTGAGTACAC
HCV 10 プライマー (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 79	CAAGAAAGGACCCGGTCGTCGGGAGAGC CATAGTGGT
HIV プライマー1 (ヒト免疫不全ウイルス 1 型)	配列番号 80	TCTTGTATTACTACTGCCCTTCAAATCCACT TTGGAAAGGACC
マラリアプライマー (プラスモ ジウム属のすべての種)	配列番号 81	GCCTGGAGTTCTATACCCAGTATAGCGTGTA TTGTTGCCTT
MS2 プライマー (バクテリオファージ MS2)	配列番号 82	GCCCAAACAACGACGATCGGTAAAACCAGCA TCCGTAGCCT
パルボプライマー (パルボウイルス B19)	配列番号 83	AGGCTTGTGTAAGTCTTCACTAGATCCCAT GCCTTATCATCC
RSV A_B 4 プライマー (RS ウイルス)	配列番号 84	ATATGGTAGAATCCTGCTTCTCCACTACAAG CAGAAATGGAACAAGT

10

20

30

40

50

【表 16 - 2】

FIP プライマー		
プライマーセット (病原体)	配列番号	配列
RSV Pr1 (RS ウイルス)	配列番号 85	GCACACTAGCATGTCCTAACATAATCAGGGC AAGTGATGTTACG
Sal_2 プライマー (サルモネラ・ティフィムリウム, LT2 株)	配列番号 86	ATGATGCCGGCAATAGCGTCACAAAGCCAG CTTTACGGTTCC
TB_3 プライマー (ヒト型結核菌)	配列番号 87	TGGAGGTGGCCATCGTGGAACCTACGTGGC CTTTGTCCAC
ジカ Pr1 (ジカウイルス)	配列番号 88	GTTAGTCCCAGGGCCATGACAAGGGGGGTT TATGCTCCTCT
ジカ_2 (ジカウイルス)	配列番号 89	AGCCAGGATTGCCAAGGTGATGGTTGGCAAT ACGAGCGAT
ジカ Pr3 (ジカウイルス)	配列番号 90	GCCAGGATTGCCAAGGTGATGTTTTGCTTTG GCCTGGTTGG

10

【表 17 - 1】

BIP プライマー		
プライマーセット (病原体)	配列番号	配列
デング熱 Pr1 (デング熱ウイルス)	配列番号 91	GGACCCATGAAATTGGTGATGGAGCCAAAA TTCCTGCTGT
デング熱 Pr2 (デング熱ウイルス)	配列番号 92	GGACCCATGAAATTGGTGATGGAGCCAAAA TTCCTGCTGT
Dev2 プライマー (人工)	配列番号 93	CAGCCTGCATAATGAAAACGGAGACAACAG ACAGAACCCAA
FluAH3N1_5 プライマー (A 型インフルエンザウイルス, H3N1 株)	配列番号 94	AGACCAATCYTGTACCTCTGACGTCTACGC TGCAGTCCT
FluA_180817_H3N2_2/3 (A 型インフルエンザウイルス, H3N2 株)	配列番号 95	GAAGGAGTACCTGAGTCTATGTGCGTCAGCAT CCACAGC
H inf プライマー (インフルエンザ菌)	配列番号 96	CTGATGATATGGGTACATCTGTTTCGCGAAGA ATGAGAAGTTTTGTGG
HAV プライマー (A 型肝炎ウイルス)	配列番号 97	TGCCTTGGATAGGGTAACAGCGCTCCGGCG TTGAATGGTT
HBV プライマー (B 型肝炎ウイルス)	配列番号 98	TCACCAACCTCCTGTCCTCAAATAAAACGC CGCAGACACAT
HCV O Pr1 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 99	CGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGCAAGCACC CTATCAGGC
HCV Pr4 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 100	TTGGATCAACCCGCTCAATGCCACCCAACAC TACTCGGCT

20

30

40

50

【表 17 - 2】

BIP プライマー		
プライマーセット (病原体)	配列番号	配列
HCV Pr5 (C型肝炎ウイルス)	配列番号 101	AACCCGCTCAATGCCTGGAGGCGACCCAAC ACTACTCG
HCV Pr6 (C型肝炎ウイルス)	配列番号 102	TAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCACTCGCAA GCACCCTAT
HCV 10 プライマー (C型肝炎ウイルス)	配列番号 103	CGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGCAAGCACC CTATCAGGC
HIV プライマー1 (ヒト免疫不全ウイルス 1型)	配列番号 104	AGTGACATAAAAAGTAGTGCCAAGAAATCATC ACCTGCCATCTG
マラリアプライマー (プラスモ ジウム属のすべての種)	配列番号 105	ACAGCCGGAAAGGTAATTTTACGAACATTTT TTAGTCCCATGCTA
MS2 プライマー (バクテリオファージ MS2)	配列番号 106	GCACGTTCTCCAACGGTGCTGGTTGCTTGTT CAGCGAACT
パルボプライマー (パルボウイルス B19)	配列番号 107	GTTAGCGTACAACACTACCCGGTATGTCAACAG CACTTTGCG
RSV A_B 4 プライマー (RS ウイルス)	配列番号 108	TCAATTTCTCACTTCTCTAGTGTTCTGTATT CTCCCATTATGCC
RSV Pr1 (RS ウイルス)	配列番号 109	TGGAACAAGTTGTTGAGGTTTATGAGGTTGT TCAATATATGGTAGAATCC
Sal_2 プライマー (サルモネ ラ・ティフィムリウム, LT2 株)	配列番号 110	GTGGGGATGACTCGCCATGGACCATCACCA ATGGTCAGC
TB_3 プライマー (ヒト型結核菌)	配列番号 111	CCATCTGGACCCGCCAACAACCCCTATCCG TATGGTGGA
ジカ Pr1 (ジカウイルス)	配列番号 112	AACGTGGTGGGACTGCTGTTACAGCTGTGA GTACTTCGCT
ジカ_2 (ジカウイルス)	配列番号 113	TGGAGAGCAGGCCTTGCTACTTCACTGCCTT TTCCCTTCAGA
ジカ Pr3 (ジカウイルス)	配列番号 114	TGGAGAGCAGGCCTTGCTACTTCACTGCCTT TTCCCTTCAGA

10

20

30

【表 18 - 1】

LF プライマー		
プライマーセット (病原体)	配列番号	配列
デング熱 Pr1 (デング熱ウイルス)	配列番号 115	GCGGTTTCTCGCGCGTTT
デング熱 Pr2 (デング熱ウイルス)	配列番号 116	なし
Dev2 プライマー (人工)	配列番号 117	CGCTGTCCAGTTCGACAAG

40

50

【表 18 - 2】

LF プライマー		
プライマーセット (病原体)	配列番号	配列
FluAH3N1_5 プライマー (A 型インフルエンザウイルス, H3N1 株)	配列番号 118	TGCAAATACAYTTCCAGTCTCTG
FluA_180817_H3N2_2/3 (A 型インフルエンザウイルス, H3N2 株)	配列番号 119	GCGGCAACAACAAGCGGGTC
H inf プライマー (インフルエンザ菌)	配列番号 120	GCAGACGACCAAAGGTATCTTG
HAV プライマー (A 型肝炎ウイルス)	配列番号 121	CAAAGAGATTCATGAAAGCCAAG
HBV プライマー (B 型肝炎ウイルス)	配列番号 122	CACGGGTGATCCCCCTA
HCV O Pr1 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 123	TGTA CTACCCGGTTCCGCAG
HCV Pr4 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 124	なし
HCV Pr5 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 125	GTGTA CTACCCGGTTCCGCAG
HCV Pr6 (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 126	GGTCGTCCTGGCAATTCCG
HCV 10 プライマー (C 型肝炎ウイルス)	配列番号 127	GTGTA CTACCCGGTTCCGCAG
HIV プライマー1 (ヒト免疫不全ウイルス 1 型)	配列番号 128	CTTTCCAGAGGAGCTTTGCT
マラリアプライマー (プラスモ ジウム属のすべての種)	配列番号 129	CGTGACGAGCGGTGTGTAC
MS2 プライマー (バクテリオファージ MS2)	配列番号 130	CCAGAGAGGAGGTTGCCAA
パルボプライマー (パルボウイルス B19)	配列番号 131	TTCTCCTCTAGGTTCTGCATGA
RSV A_B 4 プライマー (RS ウイルス)	配列番号 132	GAGCATACTCATACACCTCCACA
RSV Pr1 (RS ウイルス)	配列番号 133	CTGATTTTGCTAAGACTCCCCAC
Sal_2 プライマー (サルモネ ラ・ティフィムリウム, LT2 株)	配列番号 134	TGATAAACTTCATCGCACCGTC
TB_3 プライマー (ヒト型結核菌)	配列番号 135	AGGATCCTGCGACGTAGGCG
ジカ Pr1 (ジカウイルス)	配列番号 136	AAGTTCCTTCTCACACTGCCTTTTC
ジカ_2 (ジカウイルス)	配列番号 137	TTATCAGTGCGTGGAACAACC
ジカ Pr3 (ジカウイルス)	配列番号 138	TCAGTGCGTGGAACAACC

10

20

30

40

50

【表 19】

LB プライマー		
プライマーセット (病原体)	配列番号	配列
デング熱 Pr1 (デング熱ウイルス)	配列番号 139	CCTAAGATTTCTAGCCATACCTCCA
デング熱 Pr2 (デング熱ウイルス)	配列番号 140	CCTAAGATTTCTAGCCATACCTCCA
Dev2 プライマー (人工)	配列番号 141	TTGCCGACGACGAAAGCGA
FluAH3N1_5 プライマー (A型インフルエンザウイルス, H3N1株)	配列番号 142	GGATTTGTGTTACGCTCACCG
FluA_180817_H3N2_2/3 (A型インフルエンザウイルス, H3N2株)	配列番号 143	AGGGAAGAATATCGAAAGGAA
H inf プライマー (インフルエンザ菌)	配列番号 144	なし
HAV プライマー (A型肝炎ウイルス)	配列番号 145	CGGATATTGGTGAGTTGTTAAGACA
HBV プライマー (B型肝炎ウイルス)	配列番号 146	TTTGTCCCTGGTTATCGCTGG
HCV O Pr1 (C型肝炎ウイルス)	配列番号 147	TTGGGTCCGCGAAAGGCC
HCV Pr4 (C型肝炎ウイルス)	配列番号 148	TGGAGATTTGGGCGTGC
HCV Pr5 (C型肝炎ウイルス)	配列番号 149	TGCCCCCGCAAGACTGCTA
HCV Pr6 (C型肝炎ウイルス)	配列番号 150	CGAAAGGCCTTGTGGTACTG
HCV 10 プライマー (C型肝炎ウイルス)	配列番号 151	TTGGGTCCGCGAAAGGCC
HIV プライマー1 (ヒト免疫不全ウイルス 1型)	配列番号 152	GCAAAGATCATTAGGGATTATGGAA
マラリアプライマー (プラスモ ジウム属のすべての種)	配列番号 153	CCCTTAACGTAAAGATCATTTATGAA
MS2 プライマー (バクテリオファージ MS2)	配列番号 154	TGCAGGATGCAGCGCCTTA
パルボプライマー (パルボウイルス B19)	配列番号 155	TAACATGTTGGGCCTGGCA
RSV A_B 4 プライマー (RSウイルス)	配列番号 156	TATTGGGCAATGCTGCTGGC
RSV Pr1 (RSウイルス)	配列番号 157	CCAAAAATTGGGTGGTGAAGCA
Sal_2 プライマー (サルモネ ラ・ティフィムリウム, LT2株)	配列番号 158	TATGGATTTGTCCTCCGCCCT
TB_3 プライマー (ヒト型結核菌)	配列番号 159	GAAGGCGTACTCGACCTGAAAGAC

10

20

30

40

50

【表 19 - 2】

LB プライマー		
プライマーセット (病原体)	配列番号	配列
ジカ Pr1 (ジカウイルス)	配列番号 160	TCACAAGGAGTGGGAAGCG
ジカ_2 (ジカウイルス)	配列番号 161	GGGGGGTTTATGCTCCTCTC
ジカ Pr3 (ジカウイルス)	配列番号 162	GCGGGGGGTTTATGCTC

10

【0130】

本明細書で使用されている「含む (comprising)」という用語は、「含む (including)」、「含む (containing)」または「特徴とする (characterized by)」という用語と同義であるとともに、オープンエンドで包括的な意味であり、本明細書には記載されていないさらなる要素や工程を除外するものではない。

【0131】

前述の説明は、本発明のいくつかの方法および材料を開示するものである。本発明の方法および材料は、変更することができ、製造方法および器具も変更することができる。このような変更は、本明細書に開示された本発明の実施または本開示を考慮に入れて、当業者であれば容易に理解することができる。したがって、本発明は、本明細書に開示された特定の実施形態に限定されず、本発明の真の範囲および要旨において可能なあらゆる変更およびその他の態様を包含する。

20

【0132】

本明細書において引用された公開特許出願、非公開特許出願、特許および学術文献を含む（ただしこれらに限定されない）すべての参考文献は、引用によりその全体が本明細書に援用され、本明細書の一部を構成する。引用により援用された文献、特許または特許出願が本明細書の開示内容と矛盾する場合、このような矛盾事項よりも本明細書の記載が採用および/または優先される。

【図面】

【図 1】

【図 2 - 1】

30

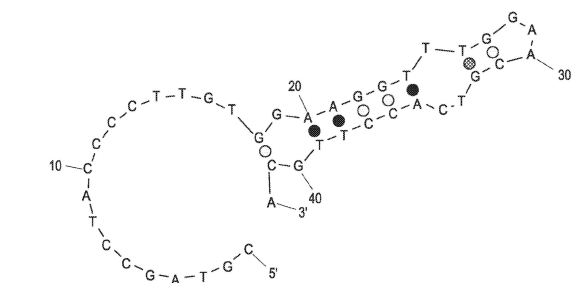


図 1A

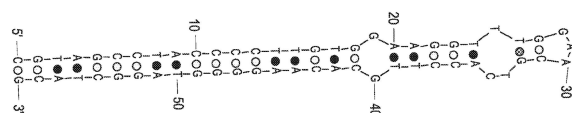


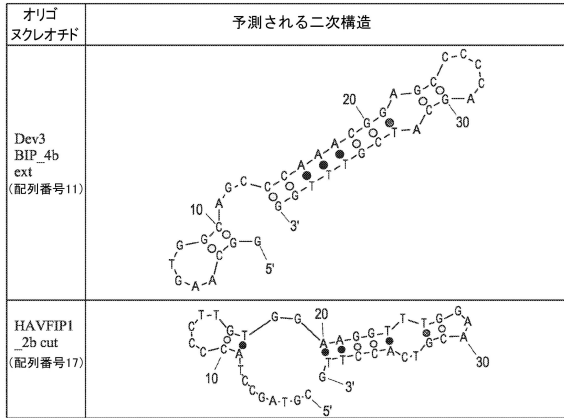
図 1B

オリゴヌクレオチド	予測される二次構造
HAVFIP1 (配列番号1)	
HAVBIP1 (配列番号94)	
Dev3 BIP (配列番号15)	

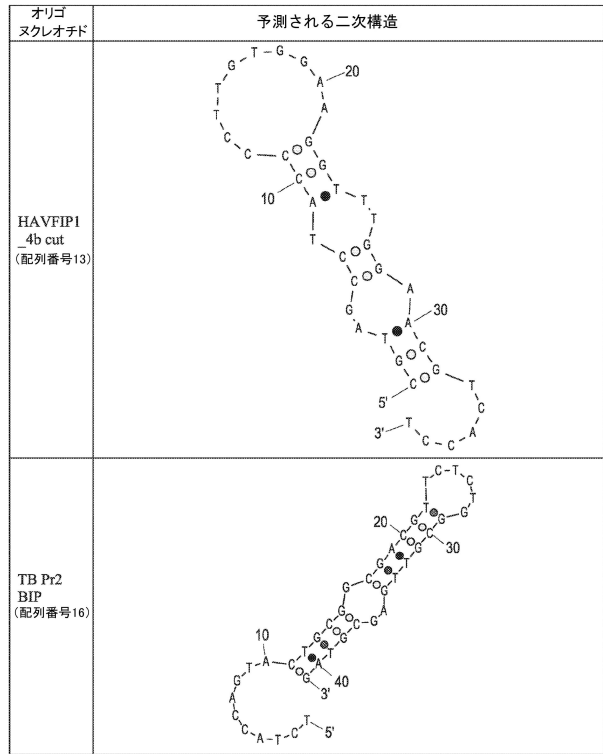
40

50

【 図 2 - 2 】



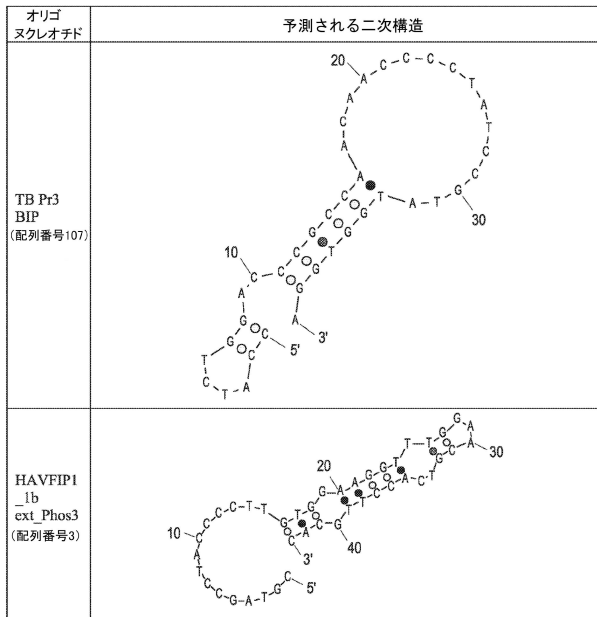
【 図 2 - 3 】



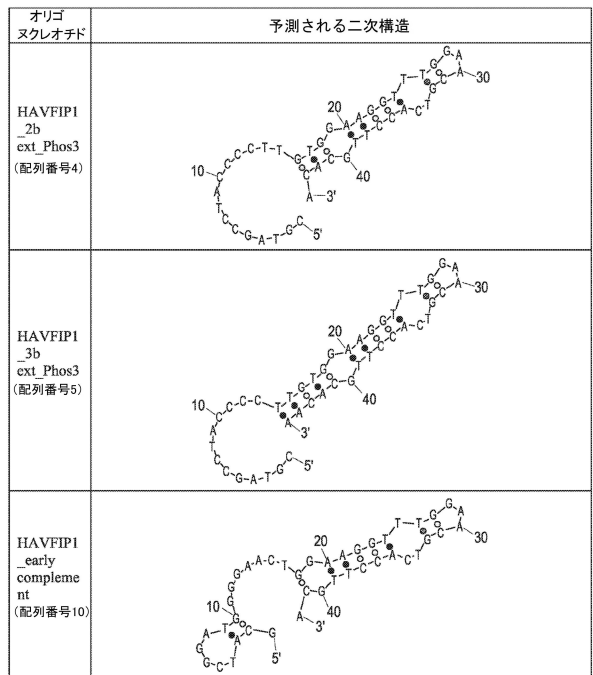
10

20

【 図 2 - 4 】



【 図 2 - 5 】

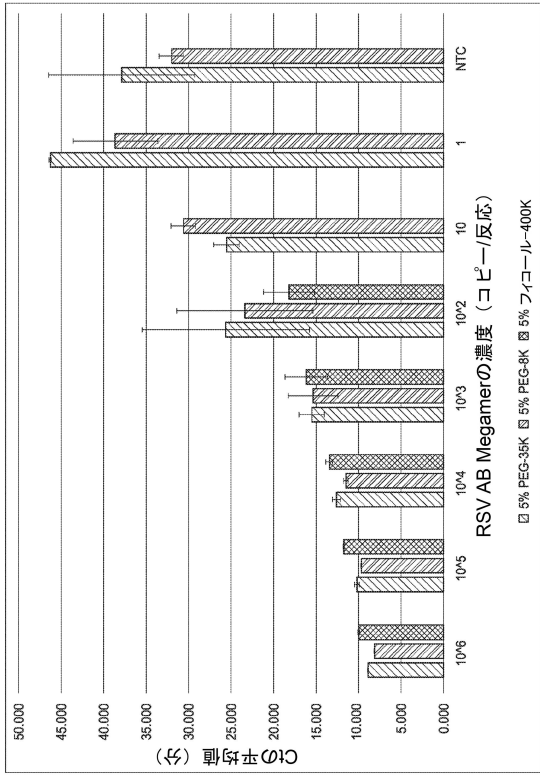


30

40

50

【 図 3 】



10

20

【 配列表 】

2022515192000001.app

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/67134

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

10

- a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

20

3. Additional comments:

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 19/67134

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 5-47, 52-85
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/67134

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC - C12Q 1/68, C12P 19/34, C07H 21/04 (2020.01)
 CPC - C12Q 1/6818, C12Q 1/6844, C12Q 1/6848, C12Q 1/686, C12Q 1/689, C12Q 2521/101, C12Q 2521/107, C12Q 2525/301, C12Q 2525/186, C12Q 2527/101, C12Q 2527/125, C12Q 2527/137, C12Q 2531/107, C12Q 2531/113, C12Q 2531/119, C12Q 2561/113

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

10

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GHAITH. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. Master of Science Thesis, August 2018 [online]. [Retrieved on 01 March 2020]. Retrieved from the Internet: <URL: http://scholar.ppu.edu/bitstream/handle/123456789/1600/Dua%20Gaith.pdf?sequence=1&isAllowed=y > pg 8, 12, 20, 21	1-4, 48-51
Y	US 2006/0177842 A1 (WANGH, et al.) 10 August 2006 (10.08.2006) claim 1, para [0012]-[0015], [0094]	1-4, 48-51

20

30

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 March 2020

Date of mailing of the international search report
01 APR 2020

40

Name and mailing address of the ISA/US
 Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
 P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
 Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer
 Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

50

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

レイテッド内

(72)発明者 ファン, リクシュン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 0 1 アラメダ, アトランティック アヴェニュー 1 0
0 0 スイート 1 1 4 アルヴェオ テクノロジーズ インコーポレイテッド内

(72)発明者 ロード, プレンナ ハーン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 0 1 アラメダ, アトランティック アヴェニュー 1 0
0 0 スイート 1 1 4 アルヴェオ テクノロジーズ インコーポレイテッド内

(72)発明者 チャン, ユーミン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 0 1 アラメダ, アトランティック アヴェニュー 1 0
0 0 スイート 1 1 4 アルヴェオ テクノロジーズ インコーポレイテッド内

(72)発明者 チャレロ, ロナルド フィリップ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 0 1 アラメダ, アトランティック アヴェニュー 1 0
0 0 スイート 1 1 4 アルヴェオ テクノロジーズ インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 4B029 AA07 BB20 FA12

4B050 CC07 DD02 KK07 LL03

4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR62 QS24

QS34 QX01 QX04