

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7370832号

(P7370832)

(45)発行日 令和5年10月30日(2023.10.30)

(24)登録日 令和5年10月20日(2023.10.20)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/11

Z Z N A

C 1 2 Q 1/6853(2018.01)

C 1 2 Q 1/6853

Z

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

C 1 2 Q 1/686

C 1 2 Q 1/6876(2018.01)

C 1 2 Q 1/6876

Z

C 1 2 Q 1/70 (2006.01)

C 1 2 Q 1/70

請求項の数 58 外国語出願 (全79頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-216301(P2019-216301)

(22)出願日 令和1年11月29日(2019.11.29)

(62)分割の表示 特願2019-552512(P2019-552512)
の分割

原出願日 平成30年3月23日(2018.3.23)

(65)公開番号 特開2020-74774(P2020-74774A)

(43)公開日 令和2年5月21日(2020.5.21)

審査請求日 令和3年3月22日(2021.3.22)

(31)優先権主張番号 62/476,753

(32)優先日 平成29年3月25日(2017.3.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 500169900

ジェン・プローブ・インコーポレーテッ
ドアメリカ合衆国カリフォルニア州921
21, サン・ディエゴ, ジェネティク
・センター・ドライブ 10210

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 マーダド アール. マジレッシ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 920
25, エスコンディード, イーストビ
ュー テラス 2833

(72)発明者 アンクル シャー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アデノウイルス、メタニューモウイルス、および／またはライノウイルス核酸を検出する
ための組成物、方法、およびキット

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも第1および第2の増幅オリゴマーを含む組成物またはキットであって、

前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号150の96
6～1147、および／または配列番号159のヌクレオチド844～1027、および
／または配列番号150の1000～1040、および／または配列番号159の880
～915、および／または配列番号150の1027～1080、および／または配列番
号159の913～958、および／または配列番号150の1073～1115、およ
び／または配列番号159の953～995から選択されるヌクレオチド位置の範囲にあ
る少なくとも1つの位置を含む、少なくとも50ヌクレオチド長のメタニューモウイルス
標的核酸を増幅するように構成され、

前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号52、53、
56および68を含み、

前記組成物またはキットが、少なくとも1つの検出プローブオリゴマーをさらに含み、
前記少なくとも1つの検出プローブオリゴマーが配列番号67、69および70を含む、
組成物またはキット。

【請求項2】

2つ以上の標的核酸に対して構成された少なくとも第1および第2の増幅オリゴマーを
含む組成物またはキットであって、

(A) 第1の標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリ

ゴマーが、配列番号150の966～1147、および／または配列番号159のヌクレオチド844～1027、および／または配列番号150の1000～1040、および／または配列番号159の880～915、および／または配列番号150の1027～1080、および／または配列番号159の913～958、および／または配列番号150の1073～1115、および／または配列番号159の953～995から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つの位置を含む、少なくとも50ヌクレオチド長のメタニューモウイルス標的核酸を増幅するように構成され、

前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号52、53、56および68を含み、

前記組成物またはキットが、少なくとも1つの検出プローブオリゴマーをさらに含み、前記少なくとも1つの検出プローブオリゴマーが配列番号67、69および70を含む、かつ

10

(B) 第2の標的核酸について、

(i) 前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号47の52～74および／または76～99および／または40～56および／または65～87および／または1～18および／または7～23および／または28～45および／または27～45および／または26～45および／または139～155および／または103～123および／または159～175および／または83～99および／または83～98から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つの位置を含む、少なくとも50ヌクレオチド長のアデノウイルス標的核酸を増幅するように構成された、あるいは

20

(ii) 前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号120の230～556、および／または配列番号101の199～525、および／または配列番号76の80～410、および／または配列番号120の263～303、および／または配列番号101の231～264、および／または配列番号76の106～156、および／または配列番号120の312～346、および／または配列番号101の279～314、および／または配列番号76の455～506、および／または配列番号120の480～533、および／または配列番号101の455～506、および／または配列番号76の338～397から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つの位置を含む、少なくとも50ヌクレオチド長のライノウイルス標的核酸を増幅するように構成された、組成物またはキット。

30

【請求項3】

3つ以上の標的核酸に対して構成された少なくとも第1および第2の増幅オリゴマーを含む組成物またはキットであって、

(A) 第1の標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号150の966～1147、および／または配列番号159のヌクレオチド844～1027、および／または配列番号150の1000～1040、および／または配列番号159の880～915、および／または配列番号150の1027～1080、および／または配列番号159の913～958、および／または配列番号150の1073～1115、および／または配列番号159の953～995から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つの位置を含む、少なくとも50ヌクレオチド長のメタニューモウイルス標的核酸を増幅するように構成され、

40

前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号52、53、56および68を含み、

前記組成物またはキットが、少なくとも1つの検出プローブオリゴマーをさらに含み、前記少なくとも1つの検出プローブオリゴマーが配列番号67、69および70を含む、かつ

(B) 第2の標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号47の52～74および／または76～99および／または40～56および／または65～87および／または1～18および／または7～23および／ま

50

または28～45および／または27～45および／または26～45および／または139～155および／または103～123および／または159～175および／または83～99および／または83～98から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つの位置を含む、少なくとも50ヌクレオチド長のアデノウイルス標的核酸を増幅するように構成され、かつ

(C) 第3の標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号120の230～556、および／または配列番号101の199～525、および／または配列番号76の80～410、および／または配列番号120の263～303、および／または配列番号101の231～264、および／または配列番号76の106～156、および／または配列番号120の312～346、および／または配列番号101の279～314、および／または配列番号76の455～506、および／または配列番号120の480～533、および／または配列番号101の455～506、および／または配列番号76の338～397から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つの位置を含む、少なくとも50ヌクレオチド長のライノウイルス標的核酸を増幅するように構成された、組成物またはキット。

【請求項4】

前記第1の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、少なくとも1つの非ワトソンクリック塩基、少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【請求項5】

前記第2の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、または少なくとも1つの非ワトソンクリック塩基、または少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含む、請求項1～3または4のいずれかに記載の組成物またはキット。

【請求項6】

前記メタニューモウイルス標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーが、配列番号52および53を含む、請求項1～3のいずれかに記載の組成物またはキット。

【請求項7】

前記メタニューモウイルス標的核酸について、前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号56および68を含む、請求項1～3のいずれかに記載の組成物またはキット。

【請求項8】

前記組成物またはキットが、18～36個の核酸塩基長である配列を含むメタニューモウイルス検出プローブオリゴマーをさらに含み、前記18～36個の核酸塩基が、全て配列番号161内または配列番号155内の連続した核酸塩基から選択される、請求項1～3のいずれかに記載の組成物またはキット。

【請求項9】

前記検出プローブオリゴマーのうちの少なくとも1つが、少なくとも1つの5-Me-dC、または少なくとも1つの非ワトソンクリック塩基、または少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含む、請求項8に記載の組成物またはキット。

【請求項10】

前記検出プローブオリゴマーのうちの少なくとも1つが、検出可能な標識を含む、請求項8に記載の組成物またはキット。

【請求項11】

前記検出可能な標識がフルオロフォアである、請求項10に記載の組成物またはキット。

【請求項12】

前記検出プローブオリゴマーが二重標識検出プローブオリゴマーである、請求項10または請求項11に記載の組成物またはキット。

【請求項13】

前記検出プローブオリゴマーが、蛍光検出可能な標識と、前記蛍光検出可能な標識からの蛍光発光を消光することができる消光剤部分とを含む、請求項12に記載の組成物また

10

20

30

40

50

はキット。

【請求項 14】

前記組成物またはキットが、1つ以上の追加の増幅オリゴマーをさらに含み、前記増幅オリゴマーの各々が、メタニューモウイルス標的核酸を増幅するように構成された、請求項1～3のいずれかに記載の組成物またはキット。

【請求項 15】

前記1つ以上の追加の増幅オリゴマーの各々が、配列番号151、152、153、154、158、160、177、178からなる群から別々に選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、請求項14に記載の組成物またはキット。

【請求項 16】

前記組成物またはキットが、標的ハイブリダイズ配列と固定化プローブ結合領域とを含む核酸標的捕捉プローブをさらに含む、請求項1～3のいずれかに記載の組成物またはキット。

【請求項 17】

前記標的ハイブリダイズ配列がポリKヌクレオチド配列である、請求項16に記載の組成物またはキット。

【請求項 18】

前記ポリKヌクレオチド配列がランダムなポリGU配列である、請求項17に記載の組成物またはキット。

【請求項 19】

前記固定化プローブ結合領域が、ホモポリマーヌクレオチド配列である、請求項16、17、または18に記載の組成物またはキット。

【請求項 20】

前記固定化プローブ結合領域が、T₀₋₄A₁₀₋₃₆からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項19に記載の組成物またはキット。

【請求項 21】

前記組成物が、酵素、緩衝液、dNTP、またはそれらの組み合わせをさらに含む、請求項1～3のいずれかに記載の組成物またはキット。

【請求項 22】

試料中のメタニューモウイルス標的核酸、ライノウイルス標的核酸、アデノウイルス標的核酸、またはそれらの組み合わせの有無を決定するための方法であって、

(A) 試料を請求項1～21のいずれか一項に記載の組成物またはキットに含まれる増幅オリゴマーの組み合わせと接触させるステップと、

(B) 試料中のアデノウイルス標的核酸、メタニューモウイルス標的核酸、またはライノウイルス標的核酸のうちのいずれかが、その標的核酸を増幅して増幅産物を生成するように構成された増幅オリゴマーの組み合わせによって使用される、インビトロ核酸増幅反応を実行するステップと、

(C) 前記増幅産物を検出するステップと、を含み、それにより、前記試料中の前記標的核酸の有無を決定する、方法。

【請求項 23】

前記試料がヒトに由来する試料である、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

前記試料が粘膜試料である、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

前記試料が、鼻咽頭スワブを使用して得られる、請求項23または請求項24に記載の方法。

【請求項 26】

ステップ(A)の前に、試料調製ステップを実行して、前記試料中のあらゆる標的核酸を他の試料成分から分離させる、請求項22に記載の方法。

【請求項 27】

前記試料調製ステップが標的捕捉ステップを含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記標的捕捉ステップが、前記試料を、標的ハイブリダイズ配列および固定化プローブ結合領域を含む核酸標的捕捉プローブと接触させることを含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記標的ハイブリダイズ配列がポリ K ヌクレオチド配列である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記ポリ K ヌクレオチド配列がランダムなポリ G U 配列である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

固定化プローブ結合領域が、ホモポリマーヌクレオチド配列である、請求項 28、29、または 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記固定化プローブ結合領域が、T₀₋₄A₁₀₋₃₆ からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記検出ステップ (C) が、1 つ以上の検出プローブオリゴマーを使用して実行される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 34】

前記 1 つ以上の検出プローブオリゴマーが、配列番号 48、49、54、63、64、67、69 および 70 を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記 1 つ以上の検出プローブオリゴマーがさらに、配列番号 4、10、17、18、19、20、21、22、23、24、29、30、36、37、39、40、139、140、155、156、157、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、87~94、109~114、および 131~136 からなる群から選択される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

前記検出プローブオリゴマーのうちの少なくとも 1 つが、少なくとも 1 つの 5-Me-dC、または少なくとも 1 つの非ワトソンクリック塩基、または少なくとも 1 つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 33、34 または 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記検出プローブオリゴマーのうちの少なくとも 1 つが、検出可能な標識を含む、請求項 33、34、35 または 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記検出可能な標識がフルオロフォアである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記検出プローブオリゴマーが二重標識検出プローブオリゴマーである、請求項 37 または請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記検出プローブオリゴマーが、蛍光検出可能な標識と、前記蛍光検出可能な標識からの蛍光発光を消光することができる消光剤部分とを含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記インビトロ核酸増幅反応が熱循環を含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 42】

前記インビトロ核酸増幅反応が、5' から 3' へのエキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ酵素による PCR を含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 43】

10

20

30

40

50

前記インビトロ核酸増幅反応が、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を使用して実行される、請求項22に記載の方法。

【請求項44】

前記インビトロ核酸増幅反応が、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を使用して実行され、増幅産物が、所定の閾値を超える蛍光値を決定することによって検出される、請求項22に記載の方法。

【請求項45】

試料中のメタニューモウイルス標的核酸、ライノウイルス標的核酸、アデノウイルス標的核酸、またはそれらの組み合わせのインビトロ検出のための方法であって、前記方法が、アデノウイルス標的核酸、メタニューモウイルス標的核酸、および／またはライノウイルス標的核酸を、請求項8～13のいずれかに記載の組成物またはキットに含まれる検出プローブオリゴマーと接触させることを含み、前記検出プローブオリゴマーと、前記検出プローブオリゴマーがハイブリダイズするように構成された前記標的核酸とのハイブリダイゼーションが、その標的核酸の存在を示す、方法。

【請求項46】

前記方法が、前記メタニューモウイルス標的核酸、前記アデノウイルス標的核酸、および／または前記ライノウイルス標的核酸からの増幅産物を、前記検出プローブオリゴマーと接触させることを含み、前記検出プローブオリゴマーと、前記検出プローブオリゴマーがハイブリダイズするように構成された前記増幅産物とのハイブリダイゼーションが、前記増幅産物の生成元であるその標的核酸の存在を示す、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記増幅産物が、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を使用して生成された、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記標的核酸またはそれから生成された前記増幅産物が、所定の閾値を超える蛍光値を決定することによって検出される、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

請求項1～21のいずれか一項に記載の組成物またはキットに含まれる増幅オリゴマーのうちの2つ以上を含む、メタニューモウイルス標的核酸、ライノウイルス標的核酸、アデノウイルス標的核酸、またはそれらの組み合わせの増幅のための乾燥組成物であって、前記2つ以上の増幅オリゴマーが、少なくとも配列番号52、53、56および68を含み、前記乾燥組成物は、少なくとも1つの検出プローブオリゴマーと組み合わせて使用され、前記少なくとも1つの検出プローブオリゴマーが、配列番号67、69および70を含む、乾燥組成物。

【請求項50】

請求項8～13のいずれかに記載の組成物またはキットに含まれる検出プローブオリゴマーのうちの1つ以上を含む、メタニューモウイルス標的核酸、ライノウイルス標的核酸、アデノウイルス標的核酸、またはそれらの組み合わせの有無を判定するための乾燥組成物であって、前記検出プローブオリゴマーのうちの1つ以上が、配列番号67、69および70を含み、前記乾燥組成物は、配列番号52、53、56および68を含む2つ以上の増幅オリゴマーと組み合わせて使用される、乾燥組成物。

【請求項51】

請求項1～21のいずれか一項に記載の組成物またはキットに含まれる2つ以上の増幅オリゴマーの組み合わせ、および／または、配列番号4、10、17、18、19、20、21、22、23、24、29、30、36、37、39、40、48、49、54、63、64、67、69、70、139、140、155、156、157、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、87～94、109～114、および131～136からなる群より選択される検出プローブオリゴマーを含む、メタニューモウイルス標的核酸、ライノウイルス標的核酸、アデノウイルス標的核酸、またはそれらの組み合わ

せの有無を判定するための乾燥組成物であって、前記2つ以上の増幅オリゴマーが、配列番号52、53、56および68を含み、前記検出プローブオリゴマーが、配列番号67、69および70を含む、乾燥組成物。

【請求項52】

前記乾燥組成物が、酵素、dNTP、またはその両方をさらに含む、請求項51に記載の乾燥組成物。

【請求項53】

前記酵素が、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を有する、請求項52に記載の乾燥組成物。

【請求項54】

前記酵素がポリメラーゼ酵素である、請求項52または請求項53に記載の乾燥組成物。

【請求項55】

前記乾燥組成物が、10mM以下の無機塩濃度を有する、請求項51に記載の乾燥組成物。

【請求項56】

前記乾燥組成物が、7mM以下の無機塩濃度を有する、請求項51に記載の乾燥組成物。

【請求項57】

前記乾燥組成物が、5mM以下の無機塩濃度を有する、請求項51に記載の乾燥組成物。

【請求項58】

前記乾燥組成物が、0.5mM～10mMの無機塩濃度を有する、請求項51に記載の乾燥組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017年3月25日に出願され、参照により本明細書に組み込まれる米国仮出願第62/476,753号の優先権の利益を主張する。

【0002】

分野

本開示は、感染性因子の検出、より具体的には、アデノウイルス、メタニューモウイルス、および／またはライノウイルスの検出に関する。インビトロ核酸増幅技法を使用することによる、アデノウイルス、メタニューモウイルス、および／またはライノウイルスの増幅および／または検出のための組成物、方法、およびキットが記載される。

【背景技術】

【0003】

導入

感染性疾患は、細菌性、ウイルス性、またはその他の起源にかかわらず、人間の健康に急性および慢性の課題をもたらす。多くの一般的な感染症は気道に影響を及ぼす。気道疾患は、全ての年齢の患者によく見られるが、非常に若齢の患者および非常に高齢の患者においてより深刻であることが多い。ウイルスには、DNAウイルスおよびRNAウイルスが含まれる。

【0004】

アデノウイルス(AdenoまたはAdv)は、消化管、上気道、および眼を含む様々な臓器に感染を引き起こし得る。免疫系が適切に機能している個体では、アデノウイルス感染症は、典型的には生命を脅かす疾患には関連付けられない。しかし、アデノウイルスは、HIV陽性の個体などの免疫不全の患者、および骨髄移植を受けた患者において深刻な感染症を引き起こし得る。50を超える種類のヒトアデノウイルス血清型が同定されている。アデノウイルスの様々な特性に基づいて、それらは6つの主要なサブグループ(亜属または種A～F)に分割されており、最近の文献では7番目の血清型の存在が示されている。

10

20

30

40

50

【0005】

アデノ検出を検出するための初期のアプローチは、主に血清学的検査および細胞培養に依存していた。しかし、免疫抑制を受けている患者では、免疫反応が損なわれているため、血清学的検査の使用が制限されており、陽性培養の評価は、比較的時間がかかる方法である。PCRベースのアッセイの導入により、アデノウイルスの迅速かつ特異的な感度の高い検出のための新しい方法が提供された。しかし、これらの診断アプローチの多くは、全てのアデノウイルス血清型を効果的に網羅していないし、遺伝子的に非常に多様なアデノウイルスの検出を可能にするためにストリンジェンシーの低い条件も使用する。

【0006】

異なる種間のアデノウイルスDNA配列の相同性は低い。アデノウイルスゲノム内の保存された領域でさえ、異なる種に由来するアデノウイルス間で限られた相同性しか示さない。多くの場合、同じ種に属する血清型の間でもDNA配列にかなりの違いが存在する。これらの事実は、必要な幅広い特異性を備えたアデノウイルス感染の信頼できるスクリーニングを容易にする分子検査の開発の困難さを浮き彫りにする。

【0007】

ヒトメタニューモウイルス(hMPV)は2001年に初めて分離され、現在、乳児および成人の急性気道疾患の2番目の主要な原因であると認識されている。2歳までに乳児の50%以上が感染し、5歳までにほぼ全ての子供が感染すると推定されている。hMPVは、入院した幼児の気道疾患の約5~15%を占めている(Alto, 2004, The Journal of the American Board of Family Practice/American Board of Family Practice 17:466-469, Williams et al., 2004, N Engl J Med 350:443-450)。hMPVの感染は、危険な状態にある未熟児の疾患、未熟児の慢性肺疾患、鬱血性心疾患、および免疫不全の重大な負担である(Martino et al., 2005, Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation 11:781-796)。

【0008】

hMPVに対して確立されている異なる遺伝系統は2つあり、これらはサブタイプAおよびBとして指定される。これらの系統は、融合タンパク質およびG糖タンパク質遺伝子を利用する場合が多い配列データの系統発生解析を行うことによって決定して、サブグループA1、A2、B1、およびB2にさらに分割されている。臨床症状の点では、hMPVの異なるサブグループに感染した患者の間で顕著な差異は観察されていない(Wei, H., Tsao, K., Huang, C., Huang, Y., Lin, T. J Microbiol Immunol Infect. 2012 Sep 26. pii: S1684-1182(12)00151-X)。伝播様式および病原性に関する情報は決定的なものではないが、hMPVは、インフルエンザなどの一般的な呼吸器系ウイルスと同様の手段で拡散する可能性が高い。hMPVは、他の呼吸器病原体と共感染することが示されている。hMPVは、恐らく特定の季節中に循環する様々な株およびサブタイプが原因で、感染後に部分的な免疫しか提供しないように見受けられ、個体に再感染して、病気を繰り返し発症させる可能性がある。感染は主に晩冬および早春に起こり、hMPVの各サブタイプの有病率は、年ごとに、また場所によって異なるようである。同様に、hMPVの全体的な発生率は年ごとに異なり得、気道感染症の症状のある患者におけるその有病率は2~26%の範囲であると報告されている。

【0009】

ヒトライノウイルス(HRV)は、ヒトの急性上気道感染症の最も頻繁な原因であり、通常は風邪に関連している。HRVによって引き起こされる風邪は、年間を通して発生し、秋および春に発生率のピークがあり、仕事および学校を欠席する主な理由の1つであり、大きな経済的影響がある。ライノウイルスはまた、下気道感染症を引き起こす可能性が

10

20

30

40

50

あり、その結果、小児、高齢者、免疫抑制を受けている患者に重篤な疾患が生じる。

【0010】

100を超える異なる血清型を含むHRVは、小さな非エンベロープ型の陽性(+)鎖RNAウイルスである。HRVは、エンテロウイルス(EV)も含むピコルナウイルス科の6つの属のうちの1つである。臨床検体中のHRVを検出するために、過去数年間に逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)が開発されている(例えば、Billaud et al. (2003) J. Virol. Methods 108:223-228、Blomqvist et al. (1999) J. Clin. Microbiol. 37:2813-2816、Kares et al. (2003) J Clin Virol. 2004 February, 29(2):99-104、Loens et al. (2003) J. Clin. Microbiol. 41:1971-1976、Savola inen et al. (2002) J. General Virol. 83:333-340、Steininger et al. (2001) J. Clin. Microbiol. 39:129-133)。これらのRT-PCR法のほとんどは、ピコルナウイルスゲノムの5'非コード領域の保存された配列を利用する。

10

【0011】

HRVを特異的に検出する能力、特にHRVとEVとの類似性に起因して生じ得る偽陽性を回避する能力は、診断と適切な利用可能な治療法の選択との両方に重要である。HRVに対する特定のアッセイは、新薬の開発にも重要である。例えば、臨床試験の設計では、HRV感染症の治療に使用する薬剤を評価するために試験が設計されている場合、参加者がHRV感染症であると正しく識別されることが重要である。加えて、他の臨床試験では、HRVに感染した個体を除外することが重要な場合がある。さらに、HRV検出アッセイは、実行が簡単で、解釈が容易な結果を提供し、実用的に使用するために比較的安価である必要がある。

20

【0012】

EVからHRVを区別する従来の方法は、ウイルス中和アッセイ、HRV特異的プライマー対による選択、サイズの違いに基づく2つのウイルスの増幅産物の区別、増幅産物の配列決定および既知のHRVおよびEV配列との配列の比較、またはHRVもしくはEV特異的プローブを使用したハイブリダイゼーションのいずれかによって行われてきた。これらのアプローチは、時間を要し、高価であり、および／またはアッセイ結果を正確に解釈する経験を有する熟練した技術者を必要とし得る。

30

迅速、高感度、かつ特異的な複数のアデノウイルス血清型の検出を可能にする分子ベースのアッセイが、依然として当該技術分野で必要とされている。また、迅速、高感度、かつ特異的なhMPVの複数のサブタイプおよびサブグループの検出が、依然として当該技術分野で必要とされている。さらに、特にRVをEVから区別する能力に関して、迅速、高感度、かつ特異的な様式でRVを検出する方法が、依然として当該技術分野で必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0013】

【文献】Alto, 2004, The Journal of the American Board of Family Practice/American Board of Family Practice 17:466-469
Williams et al., 2004, N Engl J Med 350:443-450
Martino et al., 2005, Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation 11:781-796
Wei, H., Tsao, K., Huang, C., Huang, Y., Lin, T. J

40

50

Microbiol Immunol Infect. 2012 Sep 26. pii: S1684-1182 (12) 00151-X
Billaud et al. (2003) J. Virol. Methods 108:223-228
Blomqvist et al. (1999) J. Clin. Microbiol. 37:2813-2816
Kares et al. (2003) J Clin Virol. 2004 February, 29 (2):99-104
Loens et al. (2003) J. Clin. Microbiol. 41:1971-1976
Savolainen et al. (2002) J. General Virol. 83:333-340
Steininger et al. (2001) J. Clin. Microbiol. 39:129-133

10

【発明の概要】

【0014】

概要

本開示の目的は、アデノウイルス、hMPV、およびHRV核酸のうちの1つ以上を特異的に増幅し、および／または高感度で検出するために使用できる方法、組成物、およびキットを提供することである。有利なことに、本方法、組成物、およびキットを使用して、アデノウイルス、hMPV、および／またはHRVの多くの（例えば、5個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、または50個以上）または全ての既知の血清型およびサブグループを高感度で特異的に検出し得る。

20

【0015】

1. 少なくとも第1および第2の増幅オリゴマーを含む組成物またはキットであって、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号47の52～74および／または76～99および／または40～56および／または65～87および／または1～18および／または7～23および／または28～45および／または27～45および／または26～45および／または139～155および／または103～123および／または159～175および／または83～99および／または83～98から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのアデノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のアデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、組成物またはキット。

30

【0016】

2. 少なくとも第1および第2の増幅オリゴマーを含む組成物またはキットであって、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号150の966～1147、および／または配列番号159のヌクレオチド844～1027、および／または配列番号150の1000～1040、および／または配列番号159の880～915、および／または配列番号150の1027～1080、および／または配列番号159の913～958、および／または配列番号150の1073～1115、および／または配列番号159の953～995から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのメタニューモウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のメタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、組成物またはキット。

40

【0017】

3. 少なくとも第1および第2の増幅オリゴマーを含む組成物またはキットであって、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号120の230～556、および／または配列番号101の199～525、および／または配列番号76の80～410、および／または配列番号120の263～303、および／または配列番号101の231～264、および／または配列番号76の106～156、お

50

および／または配列番号120の312～346、および／または配列番号101の279～314、および／または配列番号76の455～506、および／または配列番号120の480～533、および／または配列番号101の455～506、および／または配列番号76の338～397から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのライノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、組成物またはキット。

【0018】

4. 2つ以上の標的酸に対して構成される少なくとも第1および第2の増幅オリゴマーを含む組成物またはキットであって、

(A) 第1の標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号47の52～74および／または76～99および／または40～56および／または65～87および／または1～18および／または7～23および／または28～45および／または27～45および／または26～45および／または139～155および／または103～123および／または159～175および／または83～99および／または83～98から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのアデノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のアデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成され、かつ

(B) 第2の標的核酸について、

(i) 前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号150の966～1147、および／または配列番号159のヌクレオチド844～1027、および／または配列番号150の1000～1040、および／または配列番号159の880～915、および／または配列番号150の1027～1080、および／または配列番号159の913～958、および／または配列番号150の1073～1115、および／または配列番号159の953～995から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのメタニューモウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のメタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成されたか、あるいは

(ii) 前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号120の230～556、および／または配列番号101の199～525、および／または配列番号76の80～410、および／または配列番号120の263～303、および／または配列番号101の231～264、および／または配列番号76の106～156、および／または配列番号120の312～346、および／または配列番号101の279～314、および／または配列番号76の455～506、および／または配列番号120の480～533、および／または配列番号101の455～506、および／または配列番号76の338～397から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのライノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、組成物またはキット。

【0019】

5. 2つ以上の標的酸に対して構成される少なくとも第1および第2の増幅オリゴマーを含む組成物またはキットであって、

(A) 第1の標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号150の966～1147、および／または配列番号159のヌクレオチド844～1027、および／または配列番号150の1000～1040、および／または配列番号159の880～915、および／または配列番号150の1027～1080、および／または配列番号159の913～958、および／または配列番号150の1073～1115、および／または配列番号159の953～995から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのメタニューモウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のメタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成され、かつ

(B) 第2の標的核酸について、

(i) 前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号4

7の52～74および／または76～99および／または40～56および／または65～87および／または1～18および／または7～23および／または28～45および／または27～45および／または26～45および／または139～155および／または103～123および／または159～175および／または83～99および／または83～98から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのアデノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のアデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成されたか、あるいは

(ii) 前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号120の230～556、および／または配列番号101の199～525、および／または配列番号76の80～410、および／または配列番号120の263～303、および／または配列番号101の231～264、および／または配列番号76の106～156、および／または配列番号120の312～346、および／または配列番号101の279～314、および／または配列番号76の455～506、および／または配列番号120の480～533、および／または配列番号101の455～506、および／または配列番号76の338～397から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのライノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、組成物またはキット。

【0020】

6. 2つ以上の標的酸に対して構成される少なくとも第1および第2の増幅オリゴマーを含む組成物またはキットであって、

(A) 第1の標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号120の230～556、および／または配列番号101の199～525、および／または配列番号76の80～410、および／または配列番号120の263～303、および／または配列番号101の231～264、および／または配列番号76の106～156、および／または配列番号120の312～346、および／または配列番号101の279～314、および／または配列番号76の455～506、および／または配列番号120の480～533、および／または配列番号101の455～506、および／または配列番号76の338～397から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのライノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成され、かつ

(B) 第2の標的核酸について、

(i) 前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号47の52～74および／または76～99および／または40～56および／または65～87および／または1～18および／または7～23および／または28～45および／または27～45および／または26～45および／または139～155および／または103～123および／または159～175および／または83～99および／または83～98から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのアデノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のアデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成されたか、あるいは

(ii) 前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号150の966～1147、および／または配列番号159のヌクレオチド844～1027、および／または配列番号150の1000～1040、および／または配列番号159の880～915、および／または配列番号150の1027～1080、および／または配列番号159の913～958、および／または配列番号150の1073～1115、および／または配列番号159の953～995から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのメタニューモウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のメタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、組成物またはキット。

【0021】

7. 3つ以上の標的酸に対して構成される少なくとも第1および第2の増幅オリゴマー

を含む組成物またはキットであって、

(A) 第1の標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号47の52～74および／または76～99および／または40～56および／または65～87および／または1～18および／または7～23および／または28～45および／または27～45および／または26～45および／または139～155および／または103～123および／または159～175および／または83～99および／または83～98から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのアデノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のアデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成され、かつ

(B) 第2の標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号150の966～1147、および／または配列番号159のヌクレオチド844～1027、および／または配列番号150の1000～1040、および／または配列番号159の880～915、および／または配列番号150の1027～1080、および／または配列番号159の913～958、および／または配列番号150の1073～1115、および／または配列番号159の953～995から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのメタニューモウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のメタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成され、かつ

(C) 第3の標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号120の230～556、および／または配列番号101の199～525、および／または配列番号76の80～410、および／または配列番号120の263～303、および／または配列番号101の231～264、および／または配列番号76の106～156、および／または配列番号120の312～346、および／または配列番号101の279～314、および／または配列番号76の455～506、および／または配列番号120の480～533、および／または配列番号101の455～506、および／または配列番号76の338～397から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのライノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、組成物またはキット。

【0022】

8. 前記第1の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、少なくとも1つの非ワトソンクリック塩基、少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含む核酸配列を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0023】

9. 前記第2の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、または少なくとも1つの非ワトソンクリック塩基、または少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含む核酸配列を含む、請求項1～3または8のいずれかに記載の組成物またはキット。

【0024】

10. アデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第1の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、または少なくとも1つの非ワトソンクリック塩基、または少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含む核酸配列を含み、および／またはアデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第2の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、または少なくとも1つの非ワトソンクリック塩基、または少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含む核酸配列を含む、請求項4または請求項7に記載の組成物またはキット。

【0025】

11. 前記第2の標的核酸がアデノウイルス標的核酸であり、かつアデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第1の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、少なくとも1つの非ワトソンクリック塩基、少なくとも1つの縮重塩基、

10

20

30

40

50

またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含むか、あるいはアデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第2の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、少なくとも1つの非ワトソクリック塩基、少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含むか、あるいはその両方である、請求項5または請求項6に記載の組成物またはキット。

【0026】

12. メタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第1の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、少なくとも1つの非ワトソクリック塩基、少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含むか、あるいはメタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第2の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、少なくとも1つの非ワトソクリック塩基、少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含むか、あるいはその両方である、請求項5または請求項7に記載の組成物またはキット。

【0027】

13. 前記第2の標的核酸がメタニューモウイルス標的核酸であり、かつメタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第1の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、少なくとも1つの非ワトソクリック塩基、少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含むか、あるいはメタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第2の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、少なくとも1つの非ワトソクリック塩基、少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含むか、あるいはその両方である、請求項4または請求項6に記載の組成物またはキット。

【0028】

14. ライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第1の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、少なくとも1つの非ワトソクリック塩基、少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含むか、あるいはライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第2の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、少なくとも1つの非ワトソクリック塩基、少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含むか、あるいはその両方である、請求項6または請求項7に記載の組成物またはキット。

【0029】

15. 前記第2の標的核酸がライノウイルス標的核酸であり、かつライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第1の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、少なくとも1つの非ワトソクリック塩基、少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含むか、あるいはライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第2の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、少なくとも1つの非ワトソクリック塩基、少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含むか、あるいはその両方である、請求項4または請求項5に記載の組成物またはキット。

【0030】

16. 前記アデノウイルス標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーが、配列番号1、5、11、12、25、26、31、32、33、34、35、38、71、72、73、74からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、請求項1、4、7、8、10、または11のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0031】

17. 前記第2の標的核酸が、アデノウイルスであり、かつ前記第1の増幅オリゴマーが、配列番号1、5、11、12、25、26、31、32、33、34、35、38、71、72、73、74からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、請求項5、6、または9に記載の組成物またはキット。

【0032】

10

20

30

40

50

18. 前記アデノウイルス標的核酸について、前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号2、3、6、7、8、9、13、14、15、16、27、28、42、43、44、45、46、61、62、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、請求項1、4、7、8、10、または11のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0033】

19. 前記第2の標的核酸がアデノウイルスであり、かつ前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号2、3、6、7、8、9、13、14、15、16、27、28、42、43、44、45、46、61、62、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、請求項5、6、または9に記載の組成物またはキット。

10

【0034】

20. 前記メタニューモウイルス標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーが、配列番号52、53、151、152、153、154、160からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる、請求項2、5、7、8、12、または13のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0035】

21. 前記第2の標的核酸がメタニューモウイルスであり、かつ前記第1の増幅オリゴマーが、配列番号52、53、151、152、153、154、160からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる、請求項4、6、または9に記載の組成物またはキット。

20

【0036】

22. 前記メタニューモウイルス標的核酸について、前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号56、68、158、177、178からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる、請求項2、5、7、8、12、または13のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0037】

23. 前記第2の標的核酸がメタニューモウイルスであり、かつ前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号56、68、158、177、178からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる、請求項4、6、または9に記載の組成物またはキット。

30

【0038】

24. 前記ライノウイルス標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーが、配列番号50、51、59、60、65、75、77～86、102～108、121～130からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる、請求項3、6、7、8、14、または15のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0039】

25. 前記第2の標的核酸がライノウイルスであり、かつ前記第1の増幅オリゴマーが、配列番号50、51、59、60、65、75、77～86、102～108、121～130からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる、請求項4、5、または9に記載の組成物またはキット。

40

【0040】

26. 前記ライノウイルス標的核酸について、前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号57、95～100、115～119、137からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる、請求項3、6、7、8、14、または15のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0041】

27. 前記第2の標的核酸がライノウイルスであり、かつ前記第2の増幅オリゴマーが

50

、配列番号 57、95～100、115～119、137 からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる、請求項 4、5、または 9 に記載の組成物またはキット。

【0042】

28. 前記組成物またはキットが、少なくとも 1 つの検出プローブオリゴマーをさらに含む、請求項 1～27 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0043】

29. 前記組成物またはキットが、配列番号 4、10、17、18、19、20、21、22、23、24、29、30、36、37、39、40、63、64、139、140 からなる群から選択される配列を含むアデノウイルス検出プローブオリゴマーをさらに含む、請求項 1、4、7、8～11、および 16～19 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

10

【0044】

30. 前記第 2 の標的核酸がアデノウイルスであり、かつ前記組成物またはキットが、配列番号 4、10、17、18、19、20、21、22、23、24、29、30、36、37、39、40、63、64、139、140 からなる群から選択される配列を含む検出プローブオリゴマーをさらに含む、請求項 5 または 6 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0045】

31. 前記組成物またはキットが、18～36 個の核酸塩基長である配列を含むアデノウイルス検出プローブオリゴマーをさらに含み、前記 18～36 個の核酸塩基が、全て配列番号 138 内の連続した核酸塩基から選択される、請求項 1、4、7、8～11、および 16～19 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

20

【0046】

32. 前記第 2 の標的核酸がアデノウイルスであり、前記組成物またはキットが、18～36 個の核酸塩基長である配列を含む検出プローブオリゴマーをさらに含み、前記 18～36 個の核酸塩基が、全て配列番号 138 内の連続した核酸塩基から選択される、請求項 15 または 6 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0047】

33. 前記組成物またはキットが、配列番号 67、69、70、155、156、157、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、および 176 からなる群から選択される配列を含むメタニューモウイルス検出プローブオリゴマーをさらに含む、請求項 2、5、7、8、9、12、13、20、21、22、および 23 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

30

【0048】

34. 前記第 2 の標的核酸がメタニューモウイルスであり、前記組成物またはキットが、配列番号 67、69、70、155、156、157、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、および 176 からなる群から選択される配列を含む検出プローブオリゴマーをさらに含む、請求項 4 または 6 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

40

【0049】

35. 前記組成物またはキットが、18～36 個の核酸塩基長である配列を含むメタニューモウイルス検出プローブオリゴマーをさらに含み、前記 18～36 個の核酸塩基が、全て配列番号 161 内または配列番号 155 内の連続した核酸塩基から選択される、請求項 2、5、7、8、9、12、13、20、21、22、および 23 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0050】

36. 前記第 2 の標的核酸がメタニューモウイルスであり、前記組成物またはキットが、18～36 個の核酸塩基長である配列を含む検出プローブオリゴマーをさらに含み、前

50

記 18～36 個の核酸塩基が、全て配列番号 161 内または配列番号 155 内の連続した核酸塩基から選択される、請求項 4 または 6 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0051】

37. 前記組成物またはキットが、配列番号 48、49、54、87～94、109～114、および 131～136 からなる群から選択される配列を含むライノウイルス検出プローブオリゴマーをさらに含む、請求項 3、6、7、8、9、14、15、および 24～27 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0052】

38. 前記第 2 の標的核酸がライノウイルスであり、前記組成物またはキットが、配列番号 48、49、54、87～94、109～114、および 131～136 からなる群から選択される配列を含む検出プローブオリゴマーをさらに含む、請求項 4 または 5 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

10

【0053】

39. 前記検出プローブオリゴマーのうちの少なくとも 1 つが、少なくとも 1 つの 5-Me-dC、または少なくとも 1 つの非ワトソンクリック塩基、または少なくとも 1 つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 28～38 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0054】

40. 前記検出プローブオリゴマーのうちの少なくとも 1 つが、検出可能な標識を含む、請求項 28～39 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

20

【0055】

41. 前記検出可能な標識がフルオロフォアである、請求項 40 に記載の組成物またはキット。

【0056】

42. 前記検出プローブオリゴマーが二重標識検出プローブオリゴマーである、請求項 40 または請求項 41 に記載の組成物またはキット。

【0057】

43. 前記検出プローブオリゴマーが、蛍光検出可能な標識と、前記蛍光標識からの蛍光発光を消光することができる消光剤部分とを含む、請求項 42 に記載の組成物またはキット。

30

【0058】

44. 前記組成物またはキットが、1 つ以上の追加の増幅オリゴマーをさらに含み、前記増幅オリゴマーの各々が、アデノウイルス標的核酸を増幅するように構成された、請求項 1、4、7～11、16～19、28～32、および 39～43 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0059】

45. 前記第 2 の標的核酸がアデノウイルスであり、前記組成物またはキットが、1 つ以上の追加の増幅オリゴマーをさらに含み、前記増幅オリゴマーの各々が、アデノウイルス標的核酸を増幅するように構成された、請求項 5 または請求項 6 に記載の組成物またはキット。

40

【0060】

46. 前記 1 つ以上の追加の増幅オリゴマーの各々が、配列番号 1～9、11～16、25～28、31～35、38、42～46、61、62、および 71～74 からなる群から別々に選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、請求項 44 または 45 に記載の組成物またはキット。

【0061】

47. 前記組成物またはキットが、1 つ以上の追加の増幅オリゴマーをさらに含み、前記増幅オリゴマーの各々が、メタニューモウイルス標的核酸を増幅するように構成された、請求項 2、5、7、8、9、12、13、20～23、28、33～36、および 39～43 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

50

【0062】

48. 前記第2の標的核酸がメタニューモウイルスであり、前記組成物またはキットが、1つ以上の追加の増幅オリゴマーをさらに含み、前記増幅オリゴマーの各々が、メタニューモウイルス標的核酸を増幅するように構成された、請求項4または請求項6に記載の組成物またはキット。

【0063】

49. 前記1つ以上の追加の増幅オリゴマーの各々が、配列番号52、53、56、68、151、152、153、154、158、160、177、178からなる群から別々に選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、請求項47または48に記載の組成物またはキット。

【0064】

50. 前記組成物またはキットが、1つ以上の追加の増幅オリゴマーをさらに含み、前記増幅オリゴマーの各々が、ライノウイルス標的核酸を増幅するように構成された、請求項3、6、7、8、9、14、15、24～28、および37～43のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0065】

51. 前記第2の標的核酸がライノウイルスであり、前記組成物またはキットが、1つ以上の追加の増幅オリゴマーをさらに含み、前記増幅オリゴマーの各々が、ライノウイルス標的核酸を増幅するように構成された、請求項4または請求項5に記載の組成物またはキット。

【0066】

52. 前記1つ以上の追加の増幅オリゴマーの各々が、配列番号50、51、57、59、60、65、75、77～86、95～100、102～108、115～119、121～130、137からなる群から別々に選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、請求項47または48に記載の組成物またはキット。

【0067】

53. 前記組成物またはキットが、少なくとも第1および第2の増幅オリゴマー、ならびにアデノウイルス標的核酸を増幅するように構成された1つ以上の追加の増幅オリゴマーを含み、前記増幅オリゴマーの各々が、配列番号61、62、71、72、73、および74からなる群から選択される配列を独立して含む、請求項1、4、7～11、16～19、28～32、および39～47のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0068】

54. 前記組成物またはキットが、少なくとも第1および第2の増幅オリゴマー、ならびにメタニューモウイルス標的核酸を増幅するように構成された1つ以上の追加の増幅オリゴマーを含み、前記増幅オリゴマーの各々が、配列番号52、53、56、および58からなる群から選択される配列を各々独立して含む、請求項2、5、7、8、9、12、13、20～23、28、33～36、39～43、46～49、および53のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0069】

55. 前記組成物またはキットが、少なくとも第1および第2の増幅オリゴマー、ならびにライノウイルス標的核酸を増幅するように構成された1つ以上の追加の増幅オリゴマーを含み、前記増幅オリゴマーの各々が、配列番号50、51、57、59、60、および65からなる群から選択される配列を各々独立して含む、請求項3、6、7、8、9、14、15、24～28、37～43、および50～54のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0070】

56. 前記組成物またはキットが、2つのアデノウイルス検出プローブオリゴマーをさらに含み、前記検出プローブオリゴマーの各々が、配列番号63および64からなる群から選択される配列を独立して含む、請求項1、4、7～11、16～19、28～32、39～47、および53～55のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

10

20

30

40

50

【0071】

57. 前記組成物またはキットが、3つのメタニューモウイルス検出プローブオリゴマーをさらに含み、前記検出プローブオリゴマーの各々が、配列番号67、69、および70からなる群から選択される配列を独立して含む、請求項2、5、7、8、9、12、13、20～23、28、33～36、39～43、46～49、および53～56のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0072】

58. 前記組成物またはキットが、3つのライノウイルス検出プローブオリゴマーをさらに含み、前記検出プローブオリゴマーの各々が、配列番号48、49、および54からなる群から選択される配列を独立して含む、請求項3、6、7、8、9、14、15、24～28、37～43、および50～57のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

10

【0073】

59. 前記組成物またはキットが、標的ハイブリダイズ配列と固定化プローブ結合領域とを含む核酸標的捕捉プローブをさらに含み、先行する請求項のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0074】

60. 前記標的ハイブリダイズ配列がポリKヌクレオチド配列である、請求項59に記載の組成物またはキット。

【0075】

61. 前記ポリKヌクレオチド配列がランダムなポリGU配列である、請求項60に記載の組成物またはキット。

20

【0076】

62. 固定化プローブ結合領域が、好ましくはT₀₋₄A₁₀₋₃₆からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、ホモポリマーヌクレオチド配列である、請求項59、60、または61に記載の組成物またはキット。

【0077】

63. 前記組成物が、酵素、緩衝液、dNTP、またはそれらの組み合わせをさらに含む、請求項1～62のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【0078】

64. 試料中のアデノウイルス標的核酸、メタニューモウイルス標的核酸、ライノウイルス標的核酸、またはそれらの組み合わせの非存在の存在 (presence of absence) を決定するための方法であって、

30

(A) 試料を請求項1～58のいずれか一項に記載の増幅オリゴマーの組み合わせと接触させるステップと、

(B) 試料中のアデノウイルス標的核酸、メタニューモウイルス標的核酸、またはライノウイルス標的核酸のうちのいずれかが、その標的核酸を増幅して増幅産物を生成するように構成された増幅オリゴマーの組み合わせによって使用される、インビトロ核酸増幅反応を行うステップと、

(C) 前記増幅産物を検出するステップと、を含み、
それにより、前記試料中の前記標的核酸の有無を決定する、方法。

40

【0079】

65. 前記試料がヒトに由来する試料である、請求項64に記載の方法。

【0080】

66. 前記試料が粘膜試料である、請求項65に記載の方法。

【0081】

67. 前記試料が、鼻咽頭スワブを使用して得られる、請求項65または請求項66に記載の方法。

【0082】

68. ステップ(A)の前に、試料調製ステップを実行して、前記試料中のあらゆる標的核酸を他の試料成分から分離させる、請求項64～67のいずれか一項に記載の方法。

50

【0083】

69. 前記試料調製ステップが標的捕捉ステップを含む、請求項68に記載の方法。

【0084】

70. 前記標的捕捉ステップが、前記試料を、標的ハイブリダイズ配列および固定化プローブ結合領域を含む核酸標的捕捉プローブと接触させることを含む、請求項69に記載の方法。

【0085】

71. 前記標的ハイブリダイズ配列がポリKヌクレオチド配列である、請求項70に記載の方法。

【0086】

72. 前記ポリKヌクレオチド配列がランダムなポリGU配列である、請求項71に記載の方法。

【0087】

73. 固定化プローブ結合領域が、好ましくはT₀₋₄A₁₀₋₃₆からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、ホモポリマーヌクレオチド配列である、請求項70、71、または72に記載の方法。

【0088】

74. 前記検出ステップ(C)が、1つ以上の検出プローブオリゴマーを使用して実行される、請求項64～73のいずれか一項に記載の方法。

【0089】

75. 前記1つ以上の検出プローブオリゴマーの各々が、配列番号4、10、17、18、19、20、21、22、23、24、29、30、36、37、39、40、63、64、139、140、67、69、70、155、156、157、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、48、49、54、87～94、109～114、および131～136からなる群から個々に選択される、請求項74に記載の方法。

【0090】

76. 前記検出プローブオリゴマーのうちの少なくとも1つが、少なくとも1つの5-Me-dC、または少なくとも1つの非ワトソンクリック塩基、または少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含む、請求項74または75に記載の方法。

【0091】

77. 前記検出プローブオリゴマーのうちの少なくとも1つが、検出可能な標識を含む、請求項74、75、または76に記載の方法。

【0092】

78. 前記検出可能な標識がフルオロフォアである、請求項77に記載の方法。

【0093】

79. 前記検出プローブオリゴマーが二重標識検出プローブオリゴマーである、請求項77または請求項78に記載の方法。

【0094】

80. 前記検出プローブオリゴマーが、蛍光検出可能な標識と、前記蛍光標識からの蛍光発光を消光することができる消光剤部分とを含む、請求項79に記載の方法。

【0095】

81. 前記インビトロ核酸増幅反応が熱循環を含む、請求項64～80のいずれか一項に記載の方法。

【0096】

82. 前記インビトロ核酸増幅反応が、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ酵素によるPCRを含む、請求項64～81のいずれか一項に記載の方法。

【0097】

83. 前記インビトロ核酸増幅反応が、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を使用して実行される、請求項75～80のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0098】

84. 前記インビトロ核酸増幅反応が、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を使用して実行され、増幅産物が、所定の閾値を超える蛍光値を決定することによって検出される、請求項77～80のいずれか一項に記載の方法。

【0099】

85. 請求項64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、または84に記載の方法の1つ以上のステップを実行するためのシステム。

【0100】

86. 前記システムが自動システムである、請求項85に記載のシステム。

10

【0101】

87. 前記システムが、前記方法の前記ステップの全てを実行する、請求項85または86に記載のシステム。

【0102】

88. 試料中のアデノウイルス標的核酸、メタニューモウイルス標的核酸、ライノウイルス標的核酸、またはそれらの組み合わせの前記インビトロ検出のための方法であって、前記方法が、アデノウイルス標的核酸、メタニューモウイルス標的核酸、および／またはライノウイルス標的核酸を、請求項29～43のいずれかに記載の検出プローブオリゴマーと接触させることを含み、前記検出プローブオリゴマーと、前記検出プローブオリゴマーがハイブリダイズするように構成された前記標的核酸とのハイブリダイゼーションが、その標的核酸の存在を示す、方法。

20

【0103】

89. 前記方法が、前記アデノウイルス標的核酸、前記メタニューモウイルス標的核酸、および／または前記ライノウイルス標的核酸からの増幅産物を、前記検出プローブオリゴマーと接触させることを含み、前記検出プローブオリゴマーと、前記検出プローブオリゴマーがハイブリダイズするように構成された前記増幅産物とのハイブリダイゼーションが、前記増幅産物の生成元であるその標的核酸の存在を示す、請求項88に記載の方法。

【0104】

90. 前記インビトロ検出反応が、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を使用して実行される、請求項88または89に記載の方法。

30

【0105】

91. 前記インビトロ検出反応が、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を使用して実行され、前記標的核酸またはそれから生成された前記増幅産物が、所定の閾値を超える蛍光値を決定することによって検出される、請求項88～90のいずれか一項に記載の方法。

【0106】

92. 請求項88～91のいずれか一項に記載のインビトロ検出反応を実行するためのシステム。

【0107】

93. 前記システムが自動システムである、請求項92に記載のシステム。

40

【0108】

94. 前記システムが、前記方法の前記ステップの全てを実行する、請求項92または93に記載のシステム。

【0109】

95. 請求項1～27のいずれか一項に記載の増幅オリゴマーのうちの1つ以上を含む、乾燥組成物。

【0110】

96. 請求項44～55のいずれか一項に記載の増幅オリゴマーうちの1つ以上を含む、乾燥組成物。

【0111】

50

97. 請求項29～43または56～58のいずれかに記載の検出プローブオリゴマーのうちの1つ以上を含む、乾燥組成物。

【0112】

98. 請求項1～58のいずれか一項に記載の増幅オリゴマーおよび／または検出プローブオリゴマーの組み合わせを含む、乾燥組成物。

【0113】

99. 前記乾燥組成物が、酵素、dNTP、またはその両方をさらに含む、請求項95～98のいずれか一項に記載の乾燥組成物。

【0114】

100. 前記酵素が、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を有する、請求項99に記載の乾燥組成物。

【0115】

101. 前記酵素がポリメラーゼ酵素である、請求項99または請求項100に記載の乾燥組成物。

【0116】

102. 前記乾燥組成物が、10mM以下の無機塩濃度を有する、請求項95～101のいずれか一項に記載の乾燥組成物。

【0117】

103. 前記乾燥組成物が、7mM以下の無機塩濃度を有する、請求項95～102のいずれか一項に記載の乾燥組成物。

【0118】

104. 前記乾燥組成物が、5mM以下の無機塩濃度を有する、請求項95～103のいずれか一項に記載の乾燥組成物。

【0119】

105. 前記乾燥組成物が、約0.5mM～約10mMの無機塩濃度を有する、請求項95～101のいずれか一項に記載の乾燥組成物。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目1)

少なくとも第1および第2の増幅オリゴマーを含む組成物またはキットであって、

前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号47の52～74および／または76～99および／または40～56および／または65～87および／または1～18および／または7～23および／または28～45および／または27～45および／または26～45および／または139～155および／または103～123および／または159～175および／または83～99および／または83～98から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのアデノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のアデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、組成物またはキット。

(項目2)

少なくとも第1および第2の増幅オリゴマーを含む組成物またはキットであって、

前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号150の966～1147、および／または配列番号159のヌクレオチド844～1027、および／または配列番号150の1000～1040、および／または配列番号159の880～915、および／または配列番号150の1027～1080、および／または配列番号159の913～958、および／または配列番号150の1073～1115、および／または配列番号159の953～995から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのメタニューモウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のメタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、組成物またはキット。

(項目3)

少なくとも第1および第2の増幅オリゴマーを含む組成物またはキットであって、

前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号120の23

10

20

30

40

50

0～556、および／または配列番号101の199～525、および／または配列番号76の80～410、および／または配列番号120の263～303、および／または配列番号101の231～264、および／または配列番号76の106～156、および／または配列番号120の312～346、および／または配列番号101の279～314、および／または配列番号76の455～506、および／または配列番号120の480～533、および／または配列番号101の455～506、および／または配列番号76の338～397から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのライノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、組成物またはキット。

(項目4)

2つ以上の標的酸に対して構成された少なくとも第1および第2の増幅オリゴマーを含む組成物またはキットであって、

(A) 第1の標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号47の52～74および／または76～99および／または40～56および／または65～87および／または1～18および／または7～23および／または28～45および／または27～45および／または26～45および／または139～155および／または103～123および／または159～175および／または83～99および／または83～98から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのアデノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のアデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成され、かつ

(B) 第2の標的核酸について、

(i) 前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号150の966～1147、および／または配列番号159のヌクレオチド844～1027、および／または配列番号150の1000～1040、および／または配列番号159の880～915、および／または配列番号150の1027～1080、および／または配列番号159の913～958、および／または配列番号150の1073～1115、および／または配列番号159の953～995から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのメタニューモウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のメタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、あるいは

(ii) 前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号120の230～556、および／または配列番号101の199～525、および／または配列番号76の80～410、および／または配列番号120の263～303、および／または配列番号101の231～264、および／または配列番号76の106～156、および／または配列番号120の312～346、および／または配列番号101の279～314、および／または配列番号76の455～506、および／または配列番号120の480～533、および／または配列番号101の455～506、および／または配列番号76の338～397から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのライノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、組成物またはキット。

(項目5)

2つ以上の標的酸に対して構成された少なくとも第1および第2の増幅オリゴマーを含む組成物またはキットであって、

(A) 第1の標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号150の966～1147、および／または配列番号159のヌクレオチド844～1027、および／または配列番号150の1000～1040、および／または配列番号159の880～915、および／または配列番号150の1027～1080、および／または配列番号159の913～958、および／または配列番号150の1073～1115、および／または配列番号159の953～995から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのメタニューモウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のメタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように

10

20

30

40

50

構成され、かつ

(B) 第2の標的核酸について、

(i) 前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号47の52～74および／または76～99および／または40～56および／または65～87および／または1～18および／または7～23および／または28～45および／または27～45および／または26～45および／または139～155および／または103～123および／または159～175および／または83～99および／または83～98から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのアデノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のアデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、あるいは

10

(ii) 前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号120の230～556、および／または配列番号101の199～525、および／または配列番号76の80～410、および／または配列番号120の263～303、および／または配列番号101の231～264、および／または配列番号76の106～156、および／または配列番号120の312～346、および／または配列番号101の279～314、および／または配列番号76の455～506、および／または配列番号120の480～533、および／または配列番号101の455～506、および／または配列番号76の338～397から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのライノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、組成物またはキット。

20

(項目6)

2つ以上の標的酸に対して構成された少なくとも第1および第2の増幅オリゴマーを含む組成物またはキットであって、

(A) 第1の標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号120の230～556、および／または配列番号101の199～525、および／または配列番号76の80～410、および／または配列番号120の263～303、および／または配列番号101の231～264、および／または配列番号76の106～156、および／または配列番号120の312～346、および／または配列番号101の279～314、および／または配列番号76の455～506、および／または配列番号120の480～533、および／または配列番号101の455～506、および／または配列番号76の338～397から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのライノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成され、かつ

30

(B) 第2の標的核酸について、

(i) 前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号47の52～74および／または76～99および／または40～56および／または65～87および／または1～18および／または7～23および／または28～45および／または27～45および／または26～45および／または139～155および／または103～123および／または159～175および／または83～99および／または83～98から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのアデノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のアデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、あるいは

40

(ii) 前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号150の966～1147、および／または配列番号159のヌクレオチド844～1027、および／または配列番号150の1000～1040、および／または配列番号159の880～915、および／または配列番号150の1027～1080、および／または配列番号159の913～958、および／または配列番号150の1073～1115、および／または配列番号159の953～995から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのメタニューモウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のメタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、組成物ま

50

たはキット。

(項目 7)

3つ以上の標的核酸に対して構成された少なくとも第1および第2の増幅オリゴマーを含む組成物またはキットであって、

(A) 第1の標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号47の52～74および／または76～99および／または40～56および／または65～87および／または1～18および／または7～23および／または28～45および／または27～45および／または26～45および／または139～155および／または103～123および／または159～175および／または83～99および／または83～98から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのアデノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のアデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成され、かつ

10

(B) 第2の標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号150の966～1147、および／または配列番号159のヌクレオチド844～1027、および／または配列番号150の1000～1040、および／または配列番号159の880～915、および／または配列番号150の1027～1080、および／または配列番号159の913～958、および／または配列番号150の1073～1115、および／または配列番号159の953～995から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのメタニューモウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のメタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成され、かつ

20

(C) 第3の標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーおよび前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号120の230～556、および／または配列番号101の199～525、および／または配列番号76の80～410、および／または配列番号120の263～303、および／または配列番号101の231～264、および／または配列番号76の106～156、および／または配列番号120の312～346、および／または配列番号101の279～314、および／または配列番号76の455～506、および／または配列番号120の480～533、および／または配列番号101の455～506、および／または配列番号76の338～397から選択されるヌクレオチド位置の範囲にある少なくとも1つのライノウイルス位置を含む、少なくとも約50ヌクレオチド長のライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された、組成物またはキット。

30

(項目 8)

前記第1の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、少なくとも1つの非ワトソクリック塩基、少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含む、項目1～3のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目 9)

前記第2の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、または少なくとも1つの非ワトソクリック塩基、または少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含む、項目1～3または8のいずれかに記載の組成物またはキット。

40

(項目 10)

アデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第1の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、または少なくとも1つの非ワトソクリック塩基、または少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含む、および／またはアデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第2の増幅オリゴマーが、少なくとも1つの5-Me-dC、または少なくとも1つの非ワトソクリック塩基、または少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含む、項目4または項目7に記載の組成物またはキット。

(項目 11)

50

前記第 2 の標的核酸がアデノウイルス標的核酸であり、かつアデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第 1 の増幅オリゴマーが、少なくとも 1 つの 5-Me-d C、少なくとも 1 つの非ワトソククリック塩基、少なくとも 1 つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含む、あるいはアデノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第 2 の増幅オリゴマーが、少なくとも 1 つの 5-Me-d C、少なくとも 1 つの非ワトソククリック塩基、少なくとも 1 つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含む、あるいはその両方である、項目 5 または項目 6 に記載の組成物またはキット。

(項目 1 2)

メタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第 1 の増幅オリゴマーが、少なくとも 1 つの 5-Me-d C、少なくとも 1 つの非ワトソククリック塩基、少なくとも 1 つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含む、あるいはメタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第 2 の増幅オリゴマーが、少なくとも 1 つの 5-Me-d C、少なくとも 1 つの非ワトソククリック塩基、少なくとも 1 つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含む、あるいはその両方である、項目 5 または項目 7 に記載の組成物またはキット。

(項目 1 3)

前記第 2 の標的核酸がメタニューモウイルス標的核酸であり、かつメタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第 1 の増幅オリゴマーが、少なくとも 1 つの 5-Me-d C、少なくとも 1 つの非ワトソククリック塩基、少なくとも 1 つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含む、あるいはメタニューモウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第 2 の増幅オリゴマーが、少なくとも 1 つの 5-Me-d C、少なくとも 1 つの非ワトソククリック塩基、少なくとも 1 つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含む、あるいはその両方である、項目 4 または項目 6 に記載の組成物またはキット。

(項目 1 4)

ライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第 1 の増幅オリゴマーが、少なくとも 1 つの 5-Me-d C、少なくとも 1 つの非ワトソククリック塩基、少なくとも 1 つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含む、あるいはライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第 2 の増幅オリゴマーが、少なくとも 1 つの 5-Me-d C、少なくとも 1 つの非ワトソククリック塩基、少なくとも 1 つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含む、あるいはその両方である、項目 6 または項目 7 に記載の組成物またはキット。

(項目 1 5)

前記第 2 の標的核酸がライノウイルス標的核酸であり、かつライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第 1 の増幅オリゴマーが、少なくとも 1 つの 5-Me-d C、少なくとも 1 つの非ワトソククリック塩基、少なくとも 1 つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含む、あるいはライノウイルスアンプリコンを増幅するように構成された前記第 2 の増幅オリゴマーが、少なくとも 1 つの 5-Me-d C、少なくとも 1 つの非ワトソククリック塩基、少なくとも 1 つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含有する核酸配列を含む、あるいはその両方である、項目 4 または項目 5 に記載の組成物またはキット。

(項目 1 6)

前記アデノウイルス標的核酸について、前記第 1 の増幅オリゴマーが、配列番号 1、5、11、12、25、26、31、32、33、34、35、38、71、72、73、74 からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、項目 1、4、7、8、10、または 11 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目 1 7)

前記第 2 の標的核酸が、アデノウイルスであり、かつ前記第 1 の増幅オリゴマーが、配列番号 1、5、11、12、25、26、31、32、33、34、35、38、71、

10

20

30

40

50

72、73、74からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、項目5、6、または9に記載の組成物またはキット。

(項目18)

前記アデノウイルス標的核酸について、前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号2、3、6、7、8、9、13、14、15、16、27、28、42、43、44、45、46、61、62、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、項目1、4、7、8、10、または11のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目19)

前記第2の標的核酸がアデノウイルスであり、かつ前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号2、3、6、7、8、9、13、14、15、16、27、28、42、43、44、45、46、61、62、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、項目5、6、または9に記載の組成物またはキット。

(項目20)

前記メタニューモウイルス標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーが、配列番号52、53、151、152、153、154、160からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる、項目2、5、7、8、12、または13のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目21)

前記第2の標的核酸がメタニューモウイルスであり、かつ前記第1の増幅オリゴマーが、配列番号52、53、151、152、153、154、160からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる、項目4、6、または9に記載の組成物またはキット。

(項目22)

前記メタニューモウイルス標的核酸について、前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号56、68、158、177、178からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる、項目2、5、7、8、12、または13のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目23)

前記第2の標的核酸がメタニューモウイルスであり、かつ前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号56、68、158、177、178からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる、項目4、6、または9に記載の組成物またはキット。

(項目24)

前記ライノウイルス標的核酸について、前記第1の増幅オリゴマーが、配列番号50、51、59、60、65、75、77～86、102～108、121～130からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる、項目3、6、7、8、14、または15のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目25)

前記第2の標的核酸がライノウイルスであり、かつ前記第1の増幅オリゴマーが、配列番号50、51、59、60、65、75、77～86、102～108、121～130からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる、項目4、5、または9に記載の組成物またはキット。

(項目26)

前記ライノウイルス標的核酸について、前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号57、95～100、115～119、137からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる、項目3、6、7、8、14、または15のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目27)

前記第2の標的核酸がライノウイルスであり、かつ前記第2の増幅オリゴマーが、配列番号57、95～100、115～119、137からなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる、項目4、5、または9に記載の組成物またはキット。

(項目28)

前記組成物またはキットが、少なくとも1つの検出プローブオリゴマーをさらに含む、項目1～27のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目29)

前記組成物またはキットが、配列番号4、10、17、18、19、20、21、22、23、24、29、30、36、37、39、40、63、64、139、140からなる群から選択される配列を含むアデノウイルス検出プローブオリゴマーをさらに含む、項目1、4、7、8～11、および16～19のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

10

(項目30)

前記第2の標的核酸がアデノウイルスであり、かつ前記組成物またはキットが、配列番号4、10、17、18、19、20、21、22、23、24、29、30、36、37、39、40、63、64、139、140からなる群から選択される配列を含む検出プローブオリゴマーをさらに含む、項目5または6のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目31)

20

前記組成物またはキットが、18～36個の核酸塩基長である配列を含むアデノウイルス検出プローブオリゴマーをさらに含み、前記18～36個の核酸塩基が、全て配列番号138内の連続した核酸塩基から選択される、項目1、4、7、8～11、および16～19のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目32)

前記第2の標的核酸がアデノウイルスであり、前記組成物またはキットが、18～36個の核酸塩基長である配列を含む検出プローブオリゴマーをさらに含み、前記18～36個の核酸塩基が、全て配列番号138内の連続した核酸塩基から選択される、項目15または6のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目33)

30

前記組成物またはキットが、配列番号67、69、70、155、156、157、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、および176からなる群から選択される配列を含むメタニューモウイルス検出プローブオリゴマーをさらに含む、項目2、5、7、8、9、12、13、20、21、22、および23のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目34)

前記第2の標的核酸がメタニューモウイルスであり、前記組成物またはキットが、配列番号67、69、70、155、156、157、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、および176からなる群から選択される配列を含む検出プローブオリゴマーをさらに含む、項目4または6のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

40

(項目35)

前記組成物またはキットが、18～36個の核酸塩基長である配列を含むメタニューモウイルス検出プローブオリゴマーをさらに含み、前記18～36個の核酸塩基が、全て配列番号161内または配列番号155内の連続した核酸塩基から選択される、項目2、5、7、8、9、12、13、20、21、22、および23のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目36)

前記第2の標的核酸がメタニューモウイルスであり、前記組成物またはキットが、18

50

～36個の核酸塩基長である配列を含む検出プローブオリゴマーをさらに含み、前記18～36個の核酸塩基が、全て配列番号161内または配列番号155内の連続した核酸塩基から選択される、項目4または6のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目37)

前記組成物またはキットが、配列番号48、49、54、87～94、109～114、および131～136からなる群から選択される配列を含むライノウイルス検出プローブオリゴマーをさらに含み、項目3、6、7、8、9、14、15、および24～27のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目38)

前記第2の標的核酸がライノウイルスであり、前記組成物またはキットが、配列番号48、49、54、87～94、109～114、および131～136からなる群から選択される配列を含む検出プローブオリゴマーをさらに含み、項目4または5のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

10

(項目39)

前記検出プローブオリゴマーのうちの少なくとも1つが、少なくとも1つの5-Me-dC、または少なくとも1つの非ワトソンクリック塩基、または少なくとも1つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含む、項目28～38のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目40)

前記検出プローブオリゴマーのうちの少なくとも1つが、検出可能な標識を含む、項目28～39のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

20

(項目41)

前記検出可能な標識がフルオロフォアである、項目40に記載の組成物またはキット。

(項目42)

前記検出プローブオリゴマーが二重標識検出プローブオリゴマーである、項目40または項目41に記載の組成物またはキット。

(項目43)

前記検出プローブオリゴマーが、蛍光検出可能な標識と、前記蛍光標識からの蛍光発光を消光することができる消光剤部分とを含む、項目42に記載の組成物またはキット。

30

(項目44)

前記組成物またはキットが、1つ以上の追加の増幅オリゴマーをさらに含み、前記増幅オリゴマーの各々が、アデノウイルス標的核酸を増幅するように構成された、項目1、4、7～11、16～19、28～32、および39～43のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目45)

前記第2の標的核酸がアデノウイルスであり、前記組成物またはキットが、1つ以上の追加の増幅オリゴマーをさらに含み、前記増幅オリゴマーの各々が、アデノウイルス標的核酸を増幅するように構成された、項目5または項目6に記載の組成物またはキット。

(項目46)

40

前記1つ以上の追加の増幅オリゴマーの各々が、配列番号1～9、11～16、25～28、31～35、38、42～46、61、62、および71～74からなる群から別々に選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、項目44または45に記載の組成物またはキット。

(項目47)

前記組成物またはキットが、1つ以上の追加の増幅オリゴマーをさらに含み、前記増幅オリゴマーの各々が、メタニューモウイルス標的核酸を増幅するように構成された、項目2、5、7、8、9、12、13、20～23、28、33～36、および39～43のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目48)

50

前記第2の標的核酸がメタニューモウイルスであり、前記組成物またはキットが、1つ以上の追加の増幅オリゴマーをさらに含み、前記増幅オリゴマーの各々が、メタニューモウイルス標的核酸を増幅するように構成された、項目4または項目6に記載の組成物またはキット。

(項目49)

前記1つ以上の追加の増幅オリゴマーの各々が、配列番号52、53、56、68、151、152、153、154、158、160、177、178からなる群から別々に選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、項目47または48に記載の組成物またはキット。

(項目50)

前記組成物またはキットが、1つ以上の追加の増幅オリゴマーをさらに含み、前記増幅オリゴマーの各々が、ライノウイルス標的核酸を増幅するように構成された、項目3、6、7、8、9、14、15、24～28、および37～43のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目51)

前記第2の標的核酸がライノウイルスであり、前記組成物またはキットが、1つ以上の追加の増幅オリゴマーをさらに含み、前記増幅オリゴマーの各々が、ライノウイルス標的核酸を増幅するように構成された、項目4または項目5に記載の組成物またはキット。

(項目52)

前記1つ以上の追加の増幅オリゴマーの各々が、配列番号50、51、57、59、60、65、75、77～86、95～100、102～108、115～119、121～130、137からなる群から別々に選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、項目47または48に記載の組成物またはキット。

(項目53)

前記組成物またはキットが、少なくとも第1および第2の増幅オリゴマー、ならびにアデノウイルス標的核酸を増幅するように構成された1つ以上の追加の増幅オリゴマーを含み、前記増幅オリゴマーの各々が、配列番号61、62、71、72、73、および74からなる群から選択される配列を独立して含む、項目1、4、7～11、16～19、28～32、および39～47のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目54)

前記組成物またはキットが、少なくとも第1および第2の増幅オリゴマー、ならびにメタニューモウイルス標的核酸を増幅するように構成された1つ以上の追加の増幅オリゴマーを含み、前記増幅オリゴマーの各々が、配列番号52、53、56、および58からなる群から選択される配列を各々独立して含む、項目2、5、7、8、9、12、13、20～23、28、33～36、39～43、46～49、および53のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目55)

前記組成物またはキットが、少なくとも第1および第2の増幅オリゴマー、ならびにライノウイルス標的核酸を増幅するように構成された1つ以上の追加の増幅オリゴマーを含み、前記増幅オリゴマーの各々が、配列番号50、51、57、59、60、および65からなる群から選択される配列を各々独立して含む、項目3、6、7、8、9、14、15、24～28、37～43、および50～54のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目56)

前記組成物またはキットが、2つのアデノウイルス検出プローブオリゴマーをさらに含み、前記検出プローブオリゴマーの各々が、配列番号63および64からなる群から選択される配列を独立して含む、項目1、4、7～11、16～19、28～32、39～47、および53～55のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目57)

前記組成物またはキットが、3つのメタニューモウイルス検出プローブオリゴマーをさ

10

20

30

40

50

らに含み、前記検出プローブオリゴマーの各々が、配列番号 67、69、および 70 からなる群から選択される配列を独立して含む、項目 2、5、7、8、9、12、13、20～23、28、33～36、39～43、46～49、および 53～56 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目 58)

前記組成物またはキットが、3つのライノウイルス検出プローブオリゴマーをさらに含み、前記検出プローブオリゴマーの各々が、配列番号 48、49、および 54 からなる群から選択される配列を独立して含む、項目 3、6、7、8、9、14、15、24～28、37～43、および 50～57 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目 59)

前記組成物またはキットが、標的ハイブリダイズ配列と固定化プローブ結合領域とを含む核酸標的捕捉プローブをさらに含む、先行する項目のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目 60)

前記標的ハイブリダイズ配列がポリ K ヌクレオチド配列である、項目 59 に記載の組成物またはキット。

(項目 61)

前記ポリ K ヌクレオチド配列がランダムなポリ G U 配列である、項目 60 に記載の組成物またはキット。

(項目 62)

固定化プローブ結合領域が、好ましくは T₀₋₄A₁₀₋₃₆ からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、ホモポリマーヌクレオチド配列である、項目 59、60、または 61 に記載の組成物またはキット。

(項目 63)

前記組成物が、酵素、緩衝液、dNTP、またはそれらの組み合わせをさらに含む、項目 1～62 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

(項目 64)

試料中のアデノウイルス標的核酸、メタニューモウイルス標的核酸、ライノウイルス標的核酸、またはそれらの組み合わせの非存在の存在 (presence of absence) を決定するための方法であって、

(A) 試料を項目 1～58 のいずれか一項に記載の増幅オリゴマーの組み合わせと接触させるステップと、

(B) 試料中のアデノウイルス標的核酸、メタニューモウイルス標的核酸、またはライノウイルス標的核酸のうちのいずれかが、その標的核酸を増幅して増幅産物を生成するように構成された増幅オリゴマーの組み合わせによって使用される、インビトロ核酸増幅反応を実行するステップと、

(C) 前記増幅産物を検出するステップと、を含み、それにより、前記試料中の前記標的核酸の有無を決定する、方法。

(項目 65)

前記試料がヒトに由来する試料である、項目 64 に記載の方法。

(項目 66)

前記試料が粘膜試料である、項目 65 に記載の方法。

(項目 67)

前記試料が、鼻咽頭スワブを使用して得られる、項目 65 または項目 66 に記載の方法。

(項目 68)

ステップ (A) の前に、試料調製ステップを実行して、前記試料中のあらゆる標的核酸を他の試料成分から分離させる、項目 64～67 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 69)

前記試料調製ステップが標的捕捉ステップを含む、項目 68 に記載の方法。

(項目 70)

前記標的捕捉ステップが、前記試料を、標的ハイブリダイズ配列および固定化プローブ結合領域を含む核酸標的捕捉プローブと接触させることを含む、項目 69 に記載の方法。

(項目 71)

前記標的ハイブリダイズ配列がポリ K ヌクレオチド配列である、項目 70 に記載の方法。

(項目 72)

前記ポリ K ヌクレオチド配列がランダムなポリ G U 配列である、項目 71 に記載の方法。

(項目 73)

固定化プローブ結合領域が、好ましくは T₀₋₄ A₁₀₋₃₆ からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、ホモポリマーヌクレオチド配列である、項目 70、71、または 72 に記載の方法。

(項目 74)

前記検出ステップ (C) が、1 つ以上の検出プローブオリゴマーを使用して実行される、項目 64 ~ 73 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 75)

前記 1 つ以上の検出プローブオリゴマーの各々が、配列番号 4、10、17、18、19、20、21、22、23、24、29、30、36、37、39、40、63、64、139、140、67、69、70、155、156、157、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、48、49、54、87 ~ 94、109 ~ 114、および 131 ~ 136 からなる群から個々に選択される、項目 74 に記載の方法。

(項目 76)

前記検出プローブオリゴマーのうちの少なくとも 1 つが、少なくとも 1 つの 5-Me-dC、または少なくとも 1 つの非ワトソンクリック塩基、または少なくとも 1 つの縮重塩基、またはそれらの組み合わせを含む、項目 74 または 75 に記載の方法。

(項目 77)

前記検出プローブオリゴマーのうちの少なくとも 1 つが、検出可能な標識を含む、項目 74、75、または 76 に記載の方法。

(項目 78)

前記検出可能な標識がフルオロフォアである、項目 77 に記載の方法。

(項目 79)

前記検出プローブオリゴマーが二重標識検出プローブオリゴマーである、項目 77 または項目 78 に記載の方法。

(項目 80)

前記検出プローブオリゴマーが、蛍光検出可能な標識と、前記蛍光標識からの蛍光発光を消光することができる消光剤部分とを含む、項目 79 に記載の方法。

(項目 81)

前記インビトロ核酸増幅反応が熱循環を含む、項目 64 ~ 80 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 82)

前記インビトロ核酸増幅反応が、5' から 3' へのエキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ酵素による PCR を含む、項目 64 ~ 81 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 83)

前記インビトロ核酸増幅反応が、5' から 3' へのエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を使用して実行される、項目 75 ~ 80 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 84)

前記インビトロ核酸増幅反応が、5' から 3' へのエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を使用して実行され、増幅産物が、所定の閾値を超える蛍光値を決定することによって検出される、項目 77 ~ 80 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 85)

項目 64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、7

10

20

30

40

50

6、77、78、79、80、81、82、83、または84に記載の方法の1つ以上のステップを実行するためのシステム。

(項目86)

前記システムが自動システムである、項目85に記載のシステム。

(項目87)

前記システムが、前記方法の前記ステップの全てを実行する、項目85または86に記載のシステム。

(項目88)

試料中のアデノウイルス標的核酸、メタニューモウイルス標的核酸、ライノウイルス標的核酸、またはそれらの組み合わせの前記インビトロ検出のための方法であって、前記方法が、アデノウイルス標的核酸、メタニューモウイルス標的核酸、および／またはライノウイルス標的核酸を、項目29～43のいずれかに記載の検出プローブオリゴマーと接触させることを含み、前記検出プローブオリゴマーと、前記検出プローブオリゴマーがハイブリダイズするように構成された前記標的核酸とのハイブリダイゼーションが、その標的核酸の存在を示す、方法。

(項目89)

前記方法が、前記アデノウイルス標的核酸、前記メタニューモウイルス標的核酸、および／または前記ライノウイルス標的核酸からの増幅産物を、前記検出プローブオリゴマーと接触させることを含み、前記検出プローブオリゴマーと、前記検出プローブオリゴマーがハイブリダイズするように構成された前記増幅産物とのハイブリダイゼーションが、前記増幅産物の生成元であるその標的核酸の存在を示す、項目88に記載の方法。

(項目90)

前記インビトロ検出反応が、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を使用して実行される、項目88または89に記載の方法。

(項目91)

前記インビトロ検出反応が、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を使用して実行され、前記標的核酸またはそれから生成された前記増幅産物が、所定の閾値を超える蛍光値を決定することによって検出される、項目88～90のいずれか一項に記載の方法。

(項目92)

項目88～91のいずれか一項に記載のインビトロ検出反応を実行するためのシステム。

(項目93)

前記システムが自動システムである、項目92に記載のシステム。

(項目94)

前記システムが、前記方法の前記ステップの全てを実行する、項目92または93に記載のシステム。

(項目95)

項目1～27のいずれか一項に記載の増幅オリゴマーのうちの1つ以上を含む、乾燥組成物。

(項目96)

項目44～55のいずれか一項に記載の増幅オリゴマーうちの1つ以上を含む、乾燥組成物。

(項目97)

項目29～43または56～58のいずれかに記載の検出プローブオリゴマーのうちの1つ以上を含む、乾燥組成物。

(項目98)

項目1～58のいずれか一項に記載の増幅オリゴマーおよび／または検出プローブオリゴマーの組み合わせを含む、乾燥組成物。

(項目99)

前記乾燥組成物が、酵素、dNTP、またはその両方をさらに含む、項目95～98の

いずれか一項に記載の乾燥組成物。

(項目 100)

前記酵素が、5' から 3' へのエキソヌクレアーゼ活性を有する、項目 99 に記載の乾燥組成物。

(項目 101)

前記酵素がポリメラーゼ酵素である、項目 99 または項目 100 に記載の乾燥組成物。

(項目 102)

前記乾燥組成物が、10 mM 以下の無機塩濃度を有する、項目 95 ～ 101 のいずれか一項に記載の乾燥組成物。

(項目 103)

前記乾燥組成物が、7 mM 以下の無機塩濃度を有する、項目 95 ～ 102 のいずれか一項に記載の乾燥組成物。

(項目 104)

前記乾燥組成物が、5 mM 以下の無機塩濃度を有する、項目 95 ～ 103 のいずれか一項に記載の乾燥組成物。

(項目 105)

前記乾燥組成物が、約 0.5 mM ～ 約 10 mM の無機塩濃度を有する、項目 95 ～ 101 のいずれか一項に記載の乾燥組成物。

【発明を実施するための形態】

【0120】

詳細な説明

アデノウイルス、メタニューモウイルス、および／またはライノウイルス核酸の増幅検出のためのプライマーとして役立ち得る核酸オリゴマー配列が開示される。これらの標的核酸は、PCR (例えば、Taqman (商標) PCR) などのインビトロ核酸増幅法または TMA もしくは NASBA などの転写媒介増幅法を使用して、試料中で検出され得る。増幅された核酸配列の検出のためのプローブも記載される。検出プローブは、増幅プロセスの完了後または増幅プロセス中に、増幅された配列の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズする。本明細書に開示される方法は、動物およびヒトからのまたはそれらに由来する試料に存在するアデノウイルス、メタニューモウイルス、および／またはライノウイルス核酸を増幅および検出するために使用することができる。

【0121】

開示される核酸配列および方法は、試料中に存在するウイルス粒子からのまたはそれらに由来するアデノウイルス、メタニューモウイルス、および／またはライノウイルス核酸を比較的短時間で増幅および検出するのに有用であり、その結果、診断を迅速に行うことで、効果的な処置の開始を可能にし、ウイルスの蔓延を制限することができる。本方法は、アデノウイルス、メタニューモウイルス、および／またはライノウイルス感染を有する個体のスクリーニングに有用であり、特に、アデノウイルス、メタニューモウイルス、および／またはライノウイルス感染による死亡または重篤な合併症のリスクが高い患者、例えば、若齢者、高齢者、または免疫不全の個体のスクリーニングに有用である。本方法は、多くの試料の迅速なスクリーニングにも有用である。本方法は、研究所の職員が感染性病原体にさらされるリスクを最小限に抑え、それによりウイルスの感染および蔓延のリスクを制限するため、有用である。したがって、本明細書に開示される方法および組成物は、アデノウイルス、メタニューモウイルス、および／またはライノウイルスを含有し得る臨床試料の迅速、高感度、および特異的な検査の必要性に応える。

【0122】

開示されるプローブ配列はプライマーとして使用されてもよく、開示されるプライマーはプローブとして使用されてもよい。開示されるプローブドメインおよびプライマードメインについても同じことが言える。したがって、本明細書に開示されるプローブドメインはプライマードメインとして使用されてもよい。同様に、本明細書に開示されるプライマードメインはプローブドメインとして使用されてもよい。

【0123】

本明細書に開示される増幅オリゴマーは、いくつかの異なるアンプリコン種が標的特異性プライマーの取り合わせ（例えば、2つ以上、3つ以上、4つ以上（for or more）、5つ以上、6つ以上、またはさらには10以上）から生成され得る多重増幅反応の成分としてさらに企図される。例えば、本明細書に開示される増幅系のうちの2つ以上を組み合わせ、標的検出の能力、例えば、核酸を、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ以上の微生物から増幅および検出する能力が堅牢で幅広い多重アッセイをもたらすことができると企図される。例えば、本明細書で開示される増幅系を組み合わせ、以下の標的検出のための多重アッセイをもたらすことができる：アデノウイルス標的核酸および少なくとも1つの追加の標的核酸、メタニューモウイルス標的核酸および少なくとも1つの追加の標的核酸、ライノウイルス標的核酸および少なくとも1つの追加の標的核酸、アデノウイルス標的核酸およびメタニューモウイルス標的核酸および少なくとも1つの追加の標的核酸、アデノウイルス標的核酸およびライノウイルス標的核酸および少なくとも1つの追加の標的核酸、ライノウイルスの標的核酸およびメタニューモウイルスの標的核酸および少なくとも1つの追加の標的核酸、アデノウイルス標的核酸およびメタニューモウイルス標的核酸およびライノウイルス標的核酸および少なくとも1つの追加の標的核酸。本明細書に記載の多重アッセイは、種の異なるサブタイプまたはサブグループ、微生物の異なる種、またはそれらの組み合わせを各々増幅および検出する2つ以上の増幅系を提供することを含む。

10

【0124】

本開示の態様の理解を助けるために、本明細書で使用されるいくつかの用語をより詳細に説明する。本明細書で使用される他の全ての科学用語および技術用語は、*Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 2nd ed. (Singleton et al., 1994, John Wiley & Sons, New York, NY)、*The Harper Collins Dictionary of Biology* (Hale & Marham, 1991, Harper Perennial, New York, NY)、および本明細書で引用される参考文献で提供され得るものなど、関連分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。別途述べられない限り、本明細書で使用または企図される技法は、分子生物学の当業者に周知の標準的な方法である。

20

【0125】

定義

「a」または「an」、「the」の付く実体は、その実体の1つ以上を指すことに留意されたい。例えば、「核酸 (a nucleic acid)」は、1つ以上の核酸を表すと理解される。したがって、「a」（または「an」）、「1つ以上の」、および「少なくとも1つの」という用語は、本明細書において互換的に使用され得る。

30

【0126】

試料。「生体」または「臨床」試料を含む「試料」または「検体」は、核酸または核酸の断片など、アデノ、hMPV、および／もしくはHRV微生物、またはその成分を含有し得るか、またはそれが疑われ得る。試料は、成分の複雑な混合物であり得る。試料は、例えば、血液、血漿、血清、血液細胞、唾液、粘液、および脳脊髄液を含む、生きているまたは死んだ哺乳動物または微生物に由来する任意の組織または材料を含む「生体試料」を含む。試料はまた、例えば、培養培地における細胞および組織の成長から生じる馴化培地を含む、インビトロ細胞培養成分の試料を含んでもよい。組織または細胞構造を物理的または機械的に破壊し、酵素、緩衝液、塩、界面活性剤などを含有し得る溶液中に細胞内核酸を放出するように試料を処理して、分析用試料を調製してもよい。本明細書に記載の方法の1つのステップでは、少なくともアデノ、hMPV、および／またはHRV標的核酸を含有する疑いのある試料が提供される。したがって、このステップは、対象から試料を得る物理的なステップを除外する。

40

【0127】

50

核酸。核酸は、窒素ヘテロ環塩基または塩基類似体を有する2つ以上の共有結合したヌクレオシドまたはヌクレオシド類似体を含む多量体化合物を指し、ヌクレオシドは、ホスホジエステル結合または他の結合によって互いに結合して、ポリヌクレオチドを形成する。核酸は、RNA、DNA、またはキメラDNA-RNAポリマーもしくはオリゴヌクレオチド、およびそれらの類似体を含む。核酸「骨格」は、糖-ホスホジエステル結合、ペプチド-核酸結合（「ペプチド核酸」またはPNA中、PCT第WO95/32305号を参照されたい）、ホスホロチオエート結合、メチルホスホネート結合、またはそれらの組み合わせのうちの1つ以上を含む様々な結合から構成され得る。核酸の糖部分は、リボースもしくはデオキシリボースのいずれか、または既知の置換、例えば、2'メトキシ置換および2'ハライド置換（例えば2'-F）を有する同様の化合物であり得る。窒素塩基は、従来の塩基（A、G、C、T、U）、その類似体（例えば、イノシン、5メチル2'デオキシシトシン（5-Me-dC）、イソグアニン；The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36, Adams et al., ed., 11th ed., 1992, Abraham et al., 2007, BioTechniques 43:617-24）であってもよく、これは、プリンまたはピリミジン塩基の誘導体（例えば、N⁴-メチルデオキシグアノシン、デアザーまたはアザープリン、デアザーまたはアザーピリミジン、5または6位に置換基を有するピリミジン塩基、2、6、および／または8位に改変または置き換え置換基を有するプリン塩基、例えば、2-アミノ-6-メチルアミノプリン、O⁶-メチルグアニン、4-チオ-ピリミジン、4-アミノ-ピリミジン、4-ジメチルヒドラジン-ピリミジン、およびO⁴-アルキル-ピリミジン、ならびにピラゾロ-化合物、例えば、非置換または3-置換ピラゾロ[3, 4-d]ピリミジン；米国特許第5,378,825号、同第6,949,367号、およびPCT第WO93/13121号）を含む。核酸は、骨格が1つ以上の残基に対して窒素塩基を含まない「無塩基」残基を含み得る（米国特許第5,585,481号）。核酸は、RNAおよびDNAに見られるような従来の糖、塩基、および結合のみを含んでもよく、または従来の成分および置換（例えば、2'メトキシ骨格によって結合される従来の塩基、もしくは従来の塩基および1つ以上の塩基類似体の混合物を含む核酸）を含んでもよい。核酸は、「ロックド核酸」（LNA）を含んでもよく、その中で、1つ以上のヌクレオチドモノマーは、糖立体配座を模倣するRNAにロックされた二環式フラノース単位を有し、一本鎖RNA（ssRNA）、一本鎖DNA（ssDNA）、または二本鎖DNA（dsDNA）中の相補的配列に対するハイブリダイゼーション親和性を増強する（Vester et al., 2004, Biochemistry 43(42):13233-41）。核酸は、核酸の機能または挙動を変化させるための修飾塩基、例えばさらなるヌクレオチドが核酸に付加されるのを阻止するための3'末端ジデオキシヌクレオチドの付加を含み得る。インビトロで核酸を作製するための合成方法は、当該技術分野において周知であるが、核酸は、日常的な技術を使用して天然源から精製されてもよい。

【0128】

ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド。これらの用語は核酸鎖を示す。本出願全体を通して、核酸は、5'末端から3'末端に指定される。標準的な核酸、例えば、DNAおよびRNA、は、典型的には、「3'から5'に」、即ち、成長している核酸の5'末端へのヌクレオチド付加によって合成される。オリゴヌクレオチドは、「オリゴマー」および「オリゴ」と互換的に使用され、一般に1,000未満のヌクレオチド（nt）残基を有する核酸を指し、これは、約5nt残基～約900nt残基、約10nt残基～約800nt残基の範囲にあり、下限が約12～15nt、上限が約40～600ntである、ポリマーを含み、他の実施形態は、下限が約15～20nt、上限が約22～100ntである範囲にある。これらの範囲は例示にすぎず、オリゴヌクレオチドはその範囲に含まれる各整数を含み得ることが理解される。オリゴヌクレオチドは、自然発生源から精製されてもよいが、様々な周知の酵素的または化学的方法のいずれかを使用して合成されてもよい。オリゴヌクレオチドという用語は、試薬に対するいかなる特定の機能も示さず、むしろ、本明細書に記載される全てのそのような試薬を網羅するために一般的に使用される。

オリゴヌクレオチドは、様々な異なる機能を果たし得る。例えば、オリゴヌクレオチドが相補鎖に対して特異的であり、それとハイブリダイズすることが可能であり、核酸ポリメラーゼの存在下でさらに伸長され得る場合、それはプライマーとして機能してもよく、オリゴヌクレオチドがRNAポリメラーゼによって認識される配列を含有し、転写を可能にする場合、それはプロモーターを提供してもよく（例えば、T7プロバイダー）、オリゴヌクレオチドが適切に位置しおよび／または修飾される場合、それはハイブリダイゼーションを防止するかまたはプライマー伸長を妨げるように機能してもよい。

【0129】

ヌクレオチド。ヌクレオチドは、リン酸基、5炭素糖、および窒素塩基からなる核酸のサブユニットである。RNAに見られる5炭素糖は、リボースである。DNAでは、5炭素糖は、2'-デオキシリボースである。この用語はまた、リボースの2'位にあるメトキシ基（2'-O-Meまたは2'メトキシ）などのそのようなサブユニットの類似体も含む。本明細書で使用される場合、「T」残基を含有するメトキシオリゴヌクレオチドは、リボース部分の2'位にメトキシ基、およびヌクレオチドの塩基位置にウラシルを有する。オリゴヌクレオチド（例えば、プライマーまたはプローブ）中に存在する「C残基」は、文脈が別途示さない限り、メチル化シトシン（例えば、5-Me-dC）および非メチル化シトシンを含む。

【0130】

非ヌクレオチド単位。非ヌクレオチド単位は、ポリマーのハイブリダイゼーションに顕著に関与しない単位である。そのような単位は、例えば、ヌクレオチドとのいかなる顕著な水素結合にも関与してはならず、構成要素として5つのヌクレオチド塩基またはその類似体のうちの1つを有する単位を除外し得る。

【0131】

標的核酸。標的核酸は、増幅される「標的配列」を含む核酸である。標的核酸は、DNAまたはRNAであってもよく、一本鎖または二本鎖のいずれかであってもよい。標的核酸は、増幅され得る標的配列以外の他の配列を含んでもよい。典型的な標的核酸は、AdV、hMPV、およびHRVゲノムであるか、またはそれらに由来する。

【0132】

標的配列。標的配列という用語は、増幅されるべき標的核酸の特定のヌクレオチド配列を指す。標的核酸が元々一本鎖である場合、「標的配列」という用語は、標的核酸中に存在する標的配列に相補的な配列も指す。標的核酸が元々二本鎖である場合、「標的配列」という用語は、センス鎖（+）およびアンチセンス（-）鎖の両方を指す。アデノ、hMPV、またはHRV核酸の領域に関して本明細書で使用される「配列を標的にする」または「標的核酸を標的にする」という用語は、オリゴヌクレオチドが本明細書に記載の増幅および／または検出を可能にする様式で標的配列に安定してハイブリダイズするプロセスを指す。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは標的配列に相補的であり、ミスマッチを含まない。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは相補的であるが、標的配列との1つ、または2つ、または3つ、または4つ、または5つ、またはそれより多くのミスマッチを含む。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは標的配列に相補的であるが、縮重ヌクレオチド残基、非ワトソンクリック残基、またはヌクレオシド類似体のうちの1つまたは組み合わせを含む。好ましくは、標的配列に安定してハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、または50個の標的配列に相補的な連続したヌクレオチドを含む。少なくとも10個および最大で50個は包括的範囲であるため、10、50、およびそれらの間の各整数が含まれることが理解される。本明細書で使用される場合、「配列を標的にするように構成された」という用語は、増幅オリゴヌクレオチドの標的ハイブリダイズ領域が、参照アデノ、hMPV、またはHRV領域の配列を標的にし得るポリヌクレオチド配列を有するように設計されることを意味する。そのような増幅オリゴヌクレオチドは、その配列のみを標的とすることに限定されず、むしろ本明細書に記載のように、組成物として、キット内で、またはアデノ、hMPV

10

20

30

40

50

、もしくはHRV標的核酸を標的にするための方法において有用である。「するように構成された」という用語は、増幅オリゴヌクレオチド標的ハイブリダイズ配列のポリヌクレオチド配列構成の実際の配置を示す。

【0133】

単離、分離、精製は、その自然環境から核酸を取り出すことを指すが、これらの用語は、必ずしもいずれかの精製の程度を含意するものではない。これらの用語は、試料の1つ以上の成分が他の試料成分から除去または分離されることを意味する。試料成分は、通常、細胞断片、タンパク質、炭水化物、脂質、および他の核酸も含み得る、一般に水性の溶液相中の標的核酸を含む。分離することまたは精製することは、他の試料成分から標的核酸の少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも95%を除去する。純度%の範囲は、その範囲の全ての整数および有理数を含む。

10

【0134】

領域。この用語は、核酸の一部分を指し、前述の一部分は、全核酸よりも小さい。例えば、参照される核酸がオリゴヌクレオチドプロモータープロバイダーである場合、「領域」という用語は、全オリゴヌクレオチドのより小さいプロモーター部分を指すために使用されてもよい。同様に、かつまた単なる例として、核酸が標的核酸である場合、「領域」という用語は、核酸のより小さい領域を指すために使用されてもよい。

【0135】

「RNAおよびDNA等価物」とは、本質的に同じ相補的塩基対ハイブリダイゼーション特性を有するRNAおよびDNA分子を意味する。RNAおよびDNA等価物は異なる糖部分（即ちリボース対デオキシリボース）を有し、RNA中のウラシルおよびDNA中のチミンの存在によって異なり得る。等価物は特定の配列に対して同程度の相補性を有するので、RNA等価物とDNA等価物との間の相違は相同性の相違には寄与しない。別途示されない限り、アデノ、hMPV、またはHRV核酸への言及には、対応するAdv、hMPV、またはHRV RNA、およびそのDNA等価物が含まれる。

20

【0136】

本明細書で使用される場合、特定の配列の群から選択される配列を「含む」またはそれ「からなる」またはそれ「から本質的になる」核酸配列を有するオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドが、基本的な特徴および新規な特徴として、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、群の列举された核酸配列のうちの1つの正確な相補体を有する核酸に安定にハイブリダイズできることを意味する。正確な補体には、対応するDNAまたはRNA配列が含まれる。

30

【0137】

対応する。本明細書で使用される場合、核酸は、特定の核酸に、核酸がその特定の核酸と100%同一または相補的である場合に、「対応する」。

【0138】

実質的に対応する。本明細書で使用される場合、指定の核酸配列に「実質的に対応する」核酸は、言及されるオリゴヌクレオチドが参照核酸配列と十分に類似し、これにより、オリゴヌクレオチドが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で同じ標的核酸配列とハイブリダイズするという点で、参照核酸配列と同様のハイブリダイゼーション特性を有することを意味する。実質的に対応する核酸は、指定の核酸とは少なくともヌクレオチド1つ異なる。この変動は、核酸と指定の核酸との間の同一性または相補性のパーセンテージの観点から述べられ得る。したがって、核酸は、塩基同一性または相補性のこれらのパーセンテージが100%未満から約80%である場合（その中の全ての整数および有理数を含む）、参照核酸配列に実質的に対応する。

40

【0139】

ブロッキング部分。本明細書で使用される場合、「ブロッキング部分」は、核酸ポリメラーゼによって効率的に伸長することができないように、オリゴヌクレオチドまたは他の核酸の3'末端を「ブロックする」ために使用される物質である。核酸ポリメラーゼによるプライマーに基づく伸長を目的としないオリゴマーは、増幅反応におけるオリゴマーの酵

50

素媒介伸長を防止するために3'OHを置き換えるブロッカー基を含んでもよい。例えば、増幅中に存在するブロックされた増幅オリゴマーおよび／または検出プローブは、機能的3'OHを有しなくてもよく、代わりに3'末端またはその付近に位置する1個以上のブロッキング基を含んでもよい。いくつかの実施形態では、3'末端付近のブロッキング基は、3'末端の5個の残基内にあってもよく、ポリメラーゼのオリゴマーへの結合を制限するのに十分に大きい。他の実施形態では、ブロッキング基は、3'末端に共有結合している。多くの異なる化学基、例えば、アルキル基、非ヌクレオチドリンカー、アルカンジオールジデオキシヌクレオチド残基、およびコルジセピンが、3'末端をブロックするために使用され得る。

【0140】

増幅オリゴマー。「増幅オリゴヌクレオチド」または「プライマー」とも呼ばれ得る「増幅オリゴマー」は、少なくともその3'末端が標的核酸（「標的ハイブリダイズ配列」）に相補的であり、標的核酸またはその相補体にハイブリダイズし、核酸増幅反応に参与するオリゴマーである。増幅オリゴマーの例は、標的核酸にハイブリダイズし、増幅プロセスにおいてポリメラーゼによって伸長される3'OH末端を含有する「プライマー」である。増幅オリゴマーの別の例は、「プロモーターに基づく増幅オリゴマー」であり、これは、標的ハイブリダイズ配列、および適切なポリメラーゼによる転写を開始するためのプロモーター配列を含む。増幅オリゴヌクレオチドのサイズ範囲には、約10～約70nt長（その中の全ての整数および有理数を含む）の標的ハイブリダイズ領域を含むものが含まれる。一実施形態では、増幅オリゴマーは、縮重ヌクレオチド残基、非ワトソンクリック残基、またはヌクレオシド類似体のうちの1つまたは組み合わせを任意選択で含んでもよい。このため、少なくとも1つの縮重核酸塩基を含むと指定された増幅オリゴマーは、縮重ヌクレオチドによって表される核酸残基のうちの1つを各々独立して有する増幅オリゴマー種の集まりである。

【0141】

増幅。増幅は、標的核酸配列、またはその補体、またはその断片の複数のコピーを得るための任意の既知の手順を指す。複数のコピーは、アンプリコンまたは増幅産物と称され得る。「断片」の増幅は、例えば、標的核酸の内部位置にハイブリダイズし、そこから重合を開始する増幅オリゴヌクレオチドを使用することによって産生される、完全ではない標的核酸またはその相補体を含有する増幅核酸の産生を指す。既知の増幅方法には、熱循環増幅法および等温増幅法の両方が含まれる。いくつかの実施形態には、等温増幅法が好ましい。レプリカーゼ媒介増幅、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、鎖置換増幅（SDA）、および転写媒介または転写関連増幅が、核酸増幅法の非限定的な例である（例えば、米国特許第4,786,600号；米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、および同第4,800,159号；米国特許第5,427,930号および米国特許第5,516,663号；および米国特許第5,422,252号；米国特許第5,547,861号；および米国特許第5,648,211号を参照されたい）。

【0142】

「アッセイ条件」とは、標的核酸へのオリゴヌクレオチドの安定したハイブリダイゼーションを可能にする条件を意味する。アッセイ条件は、標的核酸へのオリゴヌクレオチドの優先的ハイブリダイゼーションを必要としない。

【0143】

リアルタイムでアンプリコンを検出するサイクリック増幅法において、「閾値サイクル（Threshold cycle）」（Ct）という用語は、標的の増幅に関連するシグナルの出現時間の尺度であり、一般に、正規化レポーターシグナルの標準偏差の10倍である。増幅が「閾値サイクル」に達すると、一般に、プローブが結合する配列の陽性の増幅産物があると考えられる。次いで、増幅産物の同一性を、ゲル電気泳動、核酸配列決定、および他のそのような周知の方法などの当業者に既知の方法によって決定することができる。

【0144】

リアルタイム増幅。本明細書で使用される場合、「リアルタイム増幅」という用語は、リアルタイム検出手段によって監視される標的核酸の増幅を指す。

【0145】

アンプリコン。「増幅産物」と互換的に使用されるこの用語は、標的配列内に含まれる配列に相補的または相同である、増幅手順の間に生成される核酸分子を指す。これらの用語は、一本鎖増幅産物、二本鎖増幅産物、または二本鎖増幅産物の鎖のうちの一方を指すために使用され得る。

【0146】

プローブ。「検出プローブ」または「検出オリゴヌクレオチド」としても知られるプローブは、ハイブリダイゼーションを促進して標的配列または増幅された核酸の検出を可能にする条件下で、核酸中または増幅された核酸中の標的配列に特異的にハイブリダイズする核酸オリゴマーを指す用語である。検出は、直接的（例えば、その標的配列に直接ハイブリダイズされたプローブ）または間接的（例えば、中間分子構造を介してその標的に結合されたプローブ）のいずれかであってもよい。プローブは、DNA、RNA、それらの類似体、またはそれらの組み合わせであってもよく、かつ標識されていても、または標識されていなくてもよい。プローブの「標的配列」は、一般に、標準的な塩基対合によってプローブオリゴマーの少なくとも一部に特異的にハイブリダイズする、より大きい核酸配列内のより小さい核酸配列を指す。プローブは、標的的特異的配列、およびプローブの三次元構造に寄与する他の配列を含み得る（例えば、米国特許第5,118,801号、同第5,312,728号、同第6,849,412号、同第6,835,542号、同第6,534,274号、および同第6,361,945号、ならびに米国特許出願公開第2006/0068417号）。好ましい実施形態では、検出プローブは、より高い信号の取得につながり得る2'メトキシ骨格を含む。別の好ましい実施形態では、プローブは、プローブの5'末端に共有結合したフルオロフォアと3'末端の消光剤とを含む。そのようなプローブは、Taqman（商標）プローブとして知られている。別の実施形態では、プローブは、縮重ヌクレオチド残基、非ワトソンクリック残基、またはヌクレオシド類似体のうちの1つまたは組み合わせを任意選択で含んでもよい。このため、少なくとも1つの縮重核酸塩基を含むと指定されたプローブは、縮重ヌクレオチドによって表される核酸残基のうちの1つを各々独立して有するプローブ種の集まりである。

【0147】

安定した。「安定した」または「検出に対して安定した」とは、反応混合物の温度が核酸二本鎖の融解温度より少なくとも2℃低いことを意味する。

【0148】

標識。本明細書で使用される場合、「標識」は、検出される、または検出可能なシグナルをもたらすプローブに直接的または間接的に結合された部分または化合物を指す。直接的標識化は、共有結合または非共有相互作用、例えば、水素結合、疎水性およびイオン性相互作用、またはキレートもしくは配位錯体の形成を含む、標識をプローブに連結する結合または相互作用を通して起こり得る。間接標識化は、直接的または間接的に標識され、かつ検出可能なシグナルを増幅し得る架橋部分または「リンカー」、例えば、結合対メンバー、抗体または追加のオリゴマーを使用して生じ得る。標識としては、放射性核種、リガンド（例えば、ビオチン、アビジン）、酵素もしくは酵素基質、反応基、または発色団（例えば、検出可能な色を付与する色素、粒子、もしくはビーズ）、発光化合物（例えば、生物発光、リン光、または化学発光標識（例えば、米国特許第5,656,207号、同第5,658,737号、および同第5,639,604号））、またはフルオロフォアが挙げられる。標識は、混合物中の結合標識プローブが非結合標識プローブとは異なる検出可能な変化、例えば、不安定性または特異的な分解特性を示す均質アッセイにおいて検出可能であり得る（例えば、米国特許第5,283,174号、同第5,656,207号、および同第5,658,737号）。フルオロフォアの実施形態には、約495～650nmの範囲の光を吸収し、かつ約520～670nmの範囲の光を発するものが含ま

れ、これらにはFAM（商標）、TET（商標）、CAL FLUOR（商標）（OrangeまたはRed）、およびQUASAR（商標）化合物として既知であるものが含まれる。フルオロフォアは、フルオロフォアに近接したときに光を吸収してバックグラウンド蛍光を低減する消光剤分子と組み合わせて使用されてもよい。そのような消光剤は当該技術分野で周知であり、例えば、BLACK HOLE QUENCHER（商標）（またはBHQ（商標）、BHQ-1（商標）、もしくはBHQ-2（商標））またはTAMRA（商標）化合物を含む。合成、ならびに標識を核酸に結合する方法、および標識を検出する方法は周知である（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), Chapter 10、ならびに米国特許第5,658,737号、同第5,656,207号、同第5,547,842号、同第5,283,174号、および同第4,581,333号）。2つ以上の標識および2つ以上のタイプの標識が特定のプローブ上に存在してもよく、または検出は、異なる検出可能なシグナルを産生する化合物によって各プローブが標識されるプローブの混合物を使用してもよい（例えば、米国第6,180,340号および同第6,350,579号）。

【0149】

捕捉オリゴヌクレオチド。本明細書で使用される場合、「捕捉オリゴヌクレオチド」、「標的捕捉オリゴヌクレオチド」、または「捕捉プローブ」は、固定化プローブ上の結合パートナーによって標的核酸中の標的配列にハイブリダイズし、その結合パートナーに結合して、標的核酸を支持体に捕捉する核酸オリゴマーを指す。捕捉オリゴマーの一例には、標的ハイブリダイズ配列および固定化プローブ結合領域という2つの結合領域を含むオリゴヌクレオチドが含まれる。この例の変形として、2つの領域は、1つ以上のリンカーによって互いに結合した2つの異なるオリゴマー上に存在してもよい。捕捉オリゴマーの別の実施形態として、標的ハイブリダイズ配列は、標的核酸に非特異的に結合し、それを支持体上の固定化プローブに結合するためのランダムもしくは非ランダムのポリK、ポリGU、ポリGT、またはポリU配列を含む配列である。（例えば、PCT公開第WO2008/016988号および米国特許第9,051,601号を参照されたい）。固定化プローブ結合領域は、テールと呼ばれる核酸配列であり得る。テールは、相補的固定化配列に結合する、約10～40ヌクレオチド（例えば、A₁₀～A₄₀）または約14～33 nt（例えば、T₃A₁₄～T₃A₃₀）の実質的にホモポリマーのテールを含む。このため、好ましい核酸テールの非限定的な例には、いくつかの実施形態では、T₀-4A₁₀-36配列が含まれ得る。

【0150】

固定化オリゴヌクレオチド。本明細書で使用される場合、「固定化オリゴヌクレオチド」、「固定化プローブ」、または「固定化核酸」とは、捕捉オリゴマーを支持体に直接または間接的に結合させて、捕捉プローブに結合した標的核酸を試料中の結合していない材料から分離することを容易にする核酸結合パートナーを指す。固定化プローブの一実施形態は、ニトロセルロース、ナイロン、ガラス、ポリアクリレート、混合ポリマー、ポリスチレン、シラン、ポリプロピレン、金属、または他の組成物などの支持体（その一実施形態が磁気誘引性粒子である）に結合したオリゴマーである。

【0151】

相補性。「相補的」とは、2つの一本鎖核酸の同様の領域の、または同一の一本鎖核酸の2つの異なる領域のヌクレオチド配列が、一本鎖領域がストリンジェントなハイブリダイゼーションまたは増幅条件下で、安定した二本鎖水素結合領域内で一緒にハイブリダイズすることを可能にする、ヌクレオチド塩基組成物を有することを意味する。互いにハイブリダイズする配列は、標準的な核酸塩基対合（例えば、G:C、A:T、またはA:U対合）によって、意図された標的配列に完全に相補的または部分的に相補的であり得る。「十分に相補的」とは、一連の相補的塩基間の水素結合によって別の配列にハイブリダイズすることが可能である連続した配列を意味し、これは、標準的な塩基対合によって配列

中の各位置で相補的であり得るか、あるいは標準的なA:T/UおよびG:C対合によって相補的ではないか、または無塩基残基などの修飾されたヌクレオチド、修飾されたヌクレオチドもしくはヌクレオチド類似体である1つ以上の残基を含有し得る。十分に相補的な連続した配列は、典型的には、オリゴマーが特異的にハイブリダイズすることが意図される配列に対して少なくとも80%、または少なくとも90%相補的である（相補性%の範囲はその範囲の全ての整数および有理数を含む）。「十分に相補的」である配列は、たとえ配列が完全に相補的でないとしても、適切なハイブリダイゼーション条件下で核酸オリゴマーとその標的配列との安定なハイブリダイゼーションを可能にする。ある一本鎖領域のヌクレオチドの連続した配列が、他の一本鎖領域のヌクレオチドの類似配列と一連の「基準の」水素結合塩基対を形成することが可能であり、これによりAがUまたはTと対になり、CがGと対になる場合、ヌクレオチド配列は、「完全に」相補的である。

10

【0152】

優先的にハイブリダイズする。「優先的にハイブリダイズする」とは、ストリンジェントなハイブリダイゼーションアッセイ条件下で、オリゴヌクレオチドがそれらの標的配列またはその複製物にハイブリダイズして、安定したオリゴヌクレオチド：標的配列ハイブリッドを形成すると同時に、安定したオリゴヌクレオチド：非標的配列ハイブリッドの形成が最小限に抑えられることを意味する。例えば、プローブオリゴヌクレオチドは、非標的配列よりも十分に大きい程度で標的配列またはその複製物に優先的にハイブリダイズして、当業者が、増幅中に形成された標的配列のRNA複製物または相補的DNA（cDNA）を正確に検出することを可能にする。プローブ、増幅、標的捕捉、ブロッカー、および他のオリゴヌクレオチドのための適切なハイブリダイゼーション条件は、当該技術分野において周知であり、配列組成に基づき予測され得るか、または日常的な試験法を使用することによって決定され得る（例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) の §§1.90-1.91、7.37-7.57、9.47-9.51、および11.47-11.57、特に §§9.50-9.51、11.12-11.13、11.45-11.47、および11.55-11.57）。

20

【0153】

核酸ハイブリッド。「核酸ハイブリッド」、または「ハイブリッド」、または「二重鎖」とは、二本鎖の水素結合領域を含有する核酸構造を意味し、各鎖は他方に対して相補的であり、この領域は、化学発光または蛍光の光検出、オートラジオグラフィ、またはゲル電気泳動が挙げられるが、これらに限定されない手段によって検出されるのに、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で十分に安定である。そのようなハイブリッドは、RNA:RNA、RNA:DNA、またはDNA:DNA二本鎖分子を含んでもよい。

30

【0154】

試料調製。試料調製は、試料中に存在するAdv、hMPV、またはHRV核酸のうちの1つ以上の後続する増幅および／または検出のために試料を処理する任意のステップまたは方法を指す。標的核酸は、試料中の少数成分であってもよい。試料調製は、標準的な微生物学的方法を使用して、ウイルスまたは核酸などの成分を単離または濃縮する任意の既知の方法を含んでもよい。試料調製は、濾過、遠心分離、または吸着を使用することなどによって、細胞内成分を実質的に水性または有機の相に放出するための細胞成分の物理的破壊および／または化学的溶解、ならびに破片の除去を含み得る。試料調製は、標的核酸を選択的または非特異的に捕捉し、それを他の試料成分から分離する核酸オリゴヌクレオチドの使用を含み得る（例えば、米国特許第6,110,678号、米国特許第9,051,601号、およびPCT公開第WO2008/016988号に記載されるとおり）。

40

【0155】

50

特異性。増幅系の文脈における「特異性」という用語は、配列およびアッセイ条件に依存する、標的配列および非標的配列を区別するその能力を説明する増幅系の特徴を指すために本明細書で使用される。核酸増幅に関して、特異性は、一般に、副生成物の数に対する生成された特異的アンプリコンの数の比（例えば、シグナル対ノイズ比）を指す。

【0156】

感度。「感度」という用語は、核酸増幅反応が検出または定量され得る精度を指すために本明細書で使用される。増幅反応の感度は、一般に、増幅系において確実に検出され得る標的核酸の最小コピー数の尺度であり、例えば、用いられている検出アッセイおよび増幅の特異性、例えば、副生成物に対する特異的アンプリコンの比に依存する。

【0157】

相対蛍光単位。本明細書で使用される場合、「相対蛍光単位」（「RFU」）という用語は、蛍光強度の測定の任意の単位である。RFUは、測定のために使用される検出手段の特性によって変化する。

【0158】

特に特許請求の範囲における「配列番号Xの配列」への言及は、別に示さない限り、対応する配列表に記載の塩基配列を指し、骨格（例えば、RNA、2'-O-Me RNA、もしくはDNA）の同一性または塩基修飾（例えば、シトシン残基のメチル化）を必要としない。

【0159】

オリゴマー中の「縮重」位置とは、2つ以上の塩基対がオリゴマーの集団中に存在する位置を指す。例えば、配列番号81では、8番目のヌクレオチドはRであり、これはGまたはAを表す。縮重位置を有するオリゴマーは、縮重位置の導入が所望される合成ステップにおいて、所望の縮重の組み合わせに対応するヌクレオチド前駆体の混合物を提供することによって合成することができる。結果として生じるオリゴマーは、縮重指定によって表されるヌクレオチドのうちの1つを各々含む種の混合物である。

【0160】

オリゴマー中の「非ワトソンクリック」（NWC）位置は、オリゴマーが、G-U、G-T、またはG-Aなど（GまたはU/T/Aのいずれかはオリゴマー中の塩基であり得る）の非ワトソンクリック対合により、少なくとも1つの核酸配列にハイブリダイズするように構成されている位置を指す。いくつかの実施形態では、NWC位置は、ゆらぎ（G-UまたはG-T）またはプリン-プリン（G-A）対を介してハイブリダイズするように構成される。

【0161】

アデノウイルス、メタニューモウイルス、および／またはライノウイルスの増幅のためのオリゴヌクレオチド

アデノウイルス、メタニューモウイルス、および／またはライノウイルスの標的核酸の各々を増幅するためのオリゴヌクレオチドは、典型的には、標的あたり少なくとも2つの増幅オリゴマーを含む。本開示のいくつかの実施形態は、例えば多重増幅アッセイにおいて、標的あたり2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれより多くの増幅オリゴマーを利用してもよい。したがって、例として、各標的微生物を増幅するためのオリゴヌクレオチドは、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれより多くの順方向増幅プライマーと、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれより多くの逆方向増幅プライマーとを含んでもよい。例えば、アデノウイルスを増幅するためのオリゴヌクレオチドは、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれより多くの順方向増幅プライマーと、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれより多くの逆方向増幅プライマーとを含んでもよい。hMPVを増幅するためのオリゴヌクレオチドは、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれより多くの順方向増幅プライマーと、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれより多くの逆方向増幅プライマーとを含んでもよい。HRVを増幅するためのオリゴヌクレオチドは、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれより多くの順方向増幅プライマーと、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれより多くの逆方向増幅プライマーとを含んでもよい。

10

20

30

40

50

よい。さらに、標的微生物のサブタイプまたはサブグループは、少なくとも2つの増幅オリゴマーを必要とし得、これらの増幅オリゴマーのそれぞれが、微生物のサブタイプ／サブグループのうちの1つ以上の異なるメンバー（単数または複数）に特異的なヌクレオチド配列を含む。

【0162】

アデノウイルス、メタニューモウイルス、および／またはライノウイルス標的核酸の各々を検出するためのオリゴヌクレオチドは、典型的には、標的あたり少なくとも1つの検出オリゴマーを含む。本開示のいくつかの実施形態は、例えば多重検出アッセイにおいて、標的あたり2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれより多くの検出プローブオリゴマーを利用してもよい。例えば、アデノウイルスを検出するためのオリゴヌクレオチドは、1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれより多くの検出プローブオリゴマーを含んでもよい。hMPVを検出するためのオリゴヌクレオチドは、1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれより多くの検出プローブオリゴマーを含んでもよい。HRVを検出するためのオリゴヌクレオチドは、1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれより多くの検出プローブオリゴマーを含んでもよい。さらに、標的微生物のサブタイプまたはサブグループは、少なくとも2つの検出プローブオリゴマーを必要とし得、これらの検出プローブオリゴマーのそれぞれが、微生物のサブタイプ／サブグループのうちの1つ以上の異なるメンバー（単数または複数）に特異的なヌクレオチド配列を含む。アデノウイルス、メタニューモウイルス、およびライノウイルス標的核酸のうちの1つ以上の多重増幅および検出のためのオリゴマーの組み合わせは、典型的には、少なくとも2つの順方向増幅オリゴマー、少なくとも2つの逆方向増幅オリゴマー、および少なくとも2つの検出プローブオリゴマーを含む。本開示のいくつかの実施形態は、意図される標的核酸各々に対して、2つ、3つ、4つ、5つ、またはさらに6つ、またはそれより多くの増幅オリゴマーと、2つ、3つ、4つ、5つ、またはさらに6つ、またはそれより多くのプローブとを利用してもよい。したがって、例として、いくつかの標的の多重増幅および検出のためのオリゴヌクレオチドは、6～40個の増幅オリゴマーと3～15個の検出プローブオリゴマーとを含んでもよい。

【0163】

アデノウイルス、メタニューモウイルス、および／またはライノウイルス標的核酸（アンプリコンを含む）を検出するための方法は、任意選択で、増幅産物（RNAまたはDNAアンプリコン、好ましくはDNAアンプリコン）に特異的に結合する少なくとも1つのプローブを使用する検出ステップを含む。好ましくは、プローブは、標識され、均一系で、即ち、結合プローブを非結合プローブから分離させることなく検出される信号を生成する。プローブの他の例は、プローブがその標的に結合した場合にのみ検出可能なシグナルを発する蛍光化合物で標識されてもよく、例えば、本明細書に記載のTaqman（商標）検出プローブである。

【0164】

一実施形態では、増幅オリゴマーのうちの少なくとも1つは、配列番号47のヌクレオチド1～99に対応する、または配列番号47のヌクレオチド83～175に対応するアデノウイルスの標的配列内の領域に特異的にハイブリダイズするように構成される。一実施形態では、少なくとも2つの増幅オリゴマーが使用され、該少なくとも2つの増幅オリゴマーの各々は、10～約50ヌクレオチド長であり、これらの増幅オリゴマーは、後で検出することができるアンプリコンを生成するために、それぞれ、配列番号47のヌクレオチド1～99および配列番号47のヌクレオチド83～175からなる群から選択されるアデノウイルスの標的配列内の領域に特異的にハイブリダイズするように構成される。一実施形態では、増幅オリゴマーのうちの少なくとも1つは、後で検出することができるアンプリコンを生成するために、配列番号47のヌクレオチド52～99および／または40～87および／または1～23および／または7～23および／または7～45および／または139～155および／または103～175および／または83～99および／または83～98に対応するアデノウイルスの標的配列内の領域に特異的にハイブリダイズするように構成される。一実施形態では、増幅オリゴマーのうちの少なくとも1つ

は、後で検出することができるアンプリコンを生成するために、配列番号47のヌクレオチド52～74および／または76～99および／または40～56および／または65～87および／または1～18および／または7～23および／または28～45および／または27～45および／または26～45および／または139～155および／または103～123および／または159～175および／または83～99および／または83～98に対応するアデノウイルスの標的配列内の領域に特異的にハイブリダイズするように構成される。

【0165】

アデノウイルス標的核酸を増幅および／または検出するためのオリゴヌクレオチドには、配列番号1～46、62～64、71～75、および138～149からなる群から選択されるオリゴヌクレオチド配列が含まれる。アデノウイルス核酸に特異的な増幅オリゴマーの実施形態には、配列番号1～9、11～16、25～28、31～35、38、42～46、61、62、および71～74、またはそれらの2つ以上の組み合わせからなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、またはそれから本質的になる増幅オリゴマーが含まれる。一実施形態によれば、少なくとも1つの第1の増幅オリゴマーは、配列番号1、5、11、12、25、26、31、32、33、34、35、38、71、72、73、74、またはそれらの2つ以上の組み合わせからなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる。一実施形態によれば、少なくとも1つの第2の増幅オリゴマーは、配列番号2、3、6、7、8、9、13、14、15、16、27、28、42、43、44、45、46、61、62、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、またはそれらの2つ以上の組み合わせからなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、それから本質的になる。一実施形態では、アデノウイルス標的核酸を増幅するための増幅オリゴマーのうちの1つ以上は、5-Me-dC、非ワトソンクリック塩基、縮重塩基、またはそれらの組み合わせのうちの少なくとも1つを含む。

【0166】

一実施形態では、1つ以上の検出プローブは、配列番号47のヌクレオチド74～139；および／または配列番号47のヌクレオチド56～103；および／または配列番号47のヌクレオチド18～83；および／または配列番号47のヌクレオチド23～83；および／または配列番号47のヌクレオチド23～83；および／または配列番号47のヌクレオチド23～83；および／または配列番号47のヌクレオチド52～99に対応する領域内の配列を検出するように構成される。一実施形態では、18～36個の核酸塩基長である検出プローブオリゴヌクレオチドが提供され、これらの18～36個の核酸塩基は、全て配列番号138内の連続した核酸塩基から選択される。

【0167】

アデノウイルス配列の特異的検出のためのプローブには、配列番号4、10、17、18、19、20、21、22、23、24、29、30、36、37、39、40、63、64、139、140、またはそれらの2つ以上の組み合わせからなる群から選択されるオリゴマーが含まれる。一実施形態では、アデノウイルス標的核酸（アデノウイルスアンプリコンを含む）を検出するための検出プローブオリゴマーのうちの1つ以上は、5-Me-dC、非ワトソンクリック塩基、縮重塩基、またはそれらの組み合わせのうちの少なくとも1つを含む。

【0168】

hMPV標的核酸を増幅および／または検出するためのオリゴヌクレオチドには、配列番号150のヌクレオチド966～1147、および／または配列番号159のヌクレオチド844～1027、および／または配列番号150の1000～1040、および／または配列番号159の880～915、および／または配列番号150の1027～1080、および／または配列番号159の913～958、および／または配列番号150の1073～1115、および／または配列番号159の953～995に対応する領

域内の h M P V の領域にハイブリダイズするように構成されたオリゴヌクレオチド配列が含まれる。h M P V 標的核酸を増幅および／または検出するためのオリゴヌクレオチドには、配列番号 5 2、5 3、5 6、6 7～7 0、1 5 1～1 5 8、および 1 6 1～1 7 8 からなる群から選択されるオリゴヌクレオチド配列が含まれる。増幅オリゴマーの実施形態には、配列番号 5 2、5 3、5 6、6 8、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 4、1 5 8、1 6 0、1 7 7、1 7 8、またはそれらの 2 つ以上の組み合わせからなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、またはそれから本質的になる増幅オリゴマーが含まれる。第 1 の増幅オリゴマーの実施形態には、配列番号 5 2、5 3、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 4、1 6 0、またはそれらの 2 つ以上の組み合わせからなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、またはそれから本質的になる増幅オリゴマーが含まれる。第 2 の増幅オリゴマーの実施形態には、配列番号 5 6、6 8、1 5 8、1 7 7、1 7 8、またはそれらの 2 つ以上の組み合わせからなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、またはそれから本質的になる増幅オリゴマーが含まれる。一実施形態では、h M P V 標的核酸を増幅するための増幅オリゴマーのうちの 1 つ以上は、5-Me-dC、非ワトソンクリック塩基、縮重塩基、またはそれらの組み合わせのうちの少なくとも 1 つを含む。

【0169】

h M P V 配列の特異的検出のためのプローブには、配列番号 6 7、6 9、7 0、1 5 5、1 5 6、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、またはそれらの 2 つ以上の組み合わせからなる群から選択されるオリゴマーが含まれる。一実施形態では、1 8～3 6 個の核酸塩基長である検出プローブオリゴヌクレオチドが提供され、これらの 1 8～3 6 個の核酸塩基は、全て配列番号 1 6 1 内または配列番号 1 5 5 内の連続した核酸塩基から選択される。一実施形態では、h M P V 標的核酸（h M P V アンプリコンを含む）を検出するための検出プローブオリゴマーのうちの 1 つ以上は、5-Me-dC、非ワトソンクリック塩基、縮重塩基、またはそれらの組み合わせのうちの少なくとも 1 つを含む。

【0170】

H R V 標的核酸を増幅および／または検出するためのオリゴヌクレオチドには、配列番号 1 2 0 のヌクレオチド 2 3 0～5 5 6、および／または配列番号 1 0 1 の 1 9 9～5 2 5、および／または配列番号 7 6 の 8 0～4 1 0、および／または配列番号 1 2 0 の 2 6 3～3 0 3、および／または配列番号 1 0 1 の 2 3 1～2 6 4、および／または配列番号 7 6 の 1 0 6～1 5 6、および／または配列番号 1 2 0 の 3 1 2～3 4 6、および／または配列番号 1 0 1 の 2 7 9～3 1 4、および／または配列番号 7 6 の 4 5 5～5 0 6、および／または配列番号 1 2 0 の 4 8 0～5 3 3、および／または配列番号 1 0 1 の 4 5 5～5 0 6、および／または配列番号 7 6 の 3 3 8～3 9 7 に対応する領域内の H R V の領域にハイブリダイズするように構成されたオリゴヌクレオチド配列が含まれる。H R V 標的核酸を増幅および／または検出するためのオリゴヌクレオチドには、配列番号 4 8、4 9、5 0、5 1、5 4、5 7、5 9、6 0、6 5、7 5、7 7～1 0 0、1 0 2～1 1 9、1 2 1～1 3 7、またはそれらの 2 つ以上の組み合わせからなる群から選択されるオリゴヌクレオチド配列が含まれる。増幅オリゴマーの実施形態には、配列番号 5 0、5 1、5 7、5 9、6 0、6 5、7 5、7 7～8 6、9 5～1 0 0、1 0 2～1 0 8、1 1 5～1 1 9、1 2 1～1 3 0、1 3 7、またはそれらの 2 つ以上の組み合わせからなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、またはそれから本質的になる増幅オリゴマーが含まれる。第 1 の増幅オリゴマーの実施形態には、配列番号 5 0、5 1、5 9、6 0、6 5、7 5、7 7～8 6、1 0 2～1 0 8、1 2 1～1 3 0、またはそれらの 2 つ以上の組み合わせからなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、それからなる、またはそれから本質的になる増幅オリゴマーが含まれる。第 2 の増幅オリゴマーの実施形態には、配列番号 5 7、9 5～1 0 0、1 1 5～1 1 9、1 3 7、またはそれらの 2 つ以上の組み合わせからなる群から選択される標的ハイブリダイズ配列を含む、

それからなる、またはそれから本質的になる増幅オリゴマーが含まれる。一実施形態では、18～29個の核酸塩基長である増幅オリゴヌクレオチドが提供され、これらの18～29個の核酸塩基は、全て配列番号77内の連続した核酸塩基から選択される。一実施形態では、18～27個の核酸塩基長である増幅オリゴヌクレオチドが提供され、これらの18～27個の核酸塩基は、全て配列番号95内の連続した核酸塩基から選択される。一実施形態では、18～35個の核酸塩基長である増幅オリゴヌクレオチドが提供され、これらの18～35個の核酸塩基は、全て配列番号96内の連続した核酸塩基から選択される。一実施形態では、18～27個の核酸塩基長である増幅オリゴヌクレオチドが提供され、これらの18～27個の核酸塩基は、全て配列番号115内の連続した核酸塩基から選択される。一実施形態では、18～27個の核酸塩基長である増幅オリゴヌクレオチドが提供され、これらの18～27個の核酸塩基は、全て配列番号137内の連続した核酸塩基から選択される。一実施形態では、HRV標的核酸を増幅するための増幅オリゴマーのうちの1つ以上は、5-Me-dC、非ワトソンクリック塩基、縮重塩基、またはそれらの組み合わせのうちの少なくとも1つを含む。

【0171】

HRV配列の特異的検出のためのプローブには、配列番号48、49、54、87～94、109～114、131～136、またはそれらの2つ以上の組み合わせからなる群から選択されるオリゴマーが含まれる。一実施形態では、HRV標的核酸（HRVアンプリコンを含む）を検出するための検出プローブオリゴマーのうちの1つ以上は、5-Me-dC、非ワトソンクリック塩基、縮重塩基、またはそれらの組み合わせのうちの少なくとも1つを含む。

【0172】

アデノ、hMPV、および／またはHRV核酸の検出のためのアッセイには、標的核酸の増幅および検出に使用されるものと同じ反応混合物中でIC特異的プライマーおよびプローブを使用することによって増幅および検出される内部対照（IC）核酸が含まれてもよい。IC特異的配列の増幅および検出は、試験試料（即ち、陰性試料）に対して標的的特異的シグナルが検出されない場合でも、アッセイ試薬および条件が適切に使用されたことを示す。ICは、定量的結果を提供するアッセイの内部校正として使用され得る。ICは、標的核酸ではない天然起源に由来するランダム化された配列であってもよい。

【0173】

試料調製

標的核酸配列の増幅および検出のための試料の調製は、試料中に含まれる微生物を他の試料成分から分離および／または濃縮する方法を含んでもよい。試料調製は、試料を破壊するかまたは試料を溶解して、標的核酸または標的核酸を含む遺伝子配列を含む細胞内含有物を放出する日常的な方法を含んでもよい。増幅前の試料調製は、標的核酸を他の試料成分から特異的または非特異的に分離するための任意選択の標的捕捉ステップを含んでもよい。非特異的標的捕捉法は、実質的に水性の混合物からの核酸の選択的沈殿、他の試料成分を除去するために洗浄される支持体への核酸の付着、アデノウイルス核酸および他の試料成分を含有する混合物から核酸を物理的に分離する他の方法を伴ってもよい。

【0174】

アデノウイルス標的領域の増幅

2つ以上のプライマーを使用した標的核酸標的領域の増幅は、様々な既知の核酸増幅反応を使用して達成され得る。例えば、増幅は、PCR増幅（Mullisらの米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、および同第4,800,159号）を使用して、DNAポリメラーゼを使用することによって追加のdsDNA分子を作製するために、dsDNAおよび分離された鎖の一部に特異的なプライマーを分離する熱循環反応を使用することによって複数のDNA鎖を生成することで、達成されてもよい。また、基本的なPCR法の周知の変形、例えば、Taqman PCRなどのリアルタイム検出と組み合わせたPCRを使用してもよい。

【0175】

核酸検出

核酸の検出は、様々な方法によって達成され得る。検出方法は、増幅産物の一部に相補的な標的ハイブリダイズ配列を含み、プローブ：産物複合体の存在を検出する核酸プローブを使用してもよく、または増幅産物と関連する検出可能なシグナルを増幅させ得るプローブの複合体を使用することによる（例えば、米国特許第5,424,413号、同第5,451,503号、同第5,849,481号、同第5,639,604号、および同第5,283,174号）。増幅産物と特異的に会合する直接的または間接的に標識されたプローブは、試料中の標的核酸の存在を示す検出可能なシグナルを提供する。例えば、標的核酸がアデノウイルスDNAである場合、増幅産物は、アデノウイルス標的配列内の配列またはアデノウイルス標的配列に相補的な配列を含有することになる。プローブは、増幅産物の一部に直接または間接的に結合して、試験された試料中のアデノウイルスの存在を示すように構成される。

【0176】

増幅ステップの終わり近くまたは終わりに増幅産物を検出する実施形態では、増幅産物へのプローブのハイブリダイゼーションを示すシグナルを提供するために、線状検出プローブを使用してもよい。そのような検出の一例は、標的核酸にハイブリダイズする発光標識されたプローブを使用する。次いで、発光標識は、非ハイブリダイズプローブから加水分解される。検出は、ルミノメーターを使用して化学発光によって実施される（例えば、国際特許出願公開第WO89/002476号を参照されたい）。リアルタイム検出を使用する他の実施形態では、検出プローブは、例えば、プローブが増幅産物に結合するときに検出されるレポーター部分で標識される分子ビーコン、分子トーチ、またはハイブリダイゼーションスイッチプローブなどのヘアピンプローブであってもよい。そのようなプローブは、標的ハイブリダイズ配列および非標的ハイブリダイズ配列を含み得る。そのようなプローブの様々な形態は、例えば、米国特許第5,118,801号、同第5,312,728号、同第5,925,517号、同第6,150,097号、同第6,849,412号、同第6,835,542号、同第6,534,274号、および同第6,361,945号、ならびに米国特許出願公開第2006/0068417(A1)号および同第2006/0194240(A1)号に記載されている。

【0177】

蛍光標識および電子的に検出可能な標識などの均一に検出可能な標識は、本開示の実施における使用を意図している。相互作用可能な対の標識のメンバーとして好ましい検出可能な標識の例は、FRETまたは非FRETエネルギー移動機構によって互いと相互作用する。蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）は、熱エネルギーへの変換なく、かつ供与体および受容体が動的衝突を起こすことなく、原子間距離よりもかなり長い距離にわたる、発色団間の共鳴相互作用による、吸収部位からその分子または分子系におけるその利用部位へのエネルギー量子の無放射伝達を含む。「供与体」は、最初にエネルギーを吸収する部分であり、「受容体」は、その後にエネルギーが伝達される部分であり、FRETに加えて、励起エネルギーが供与体から受容体分子に伝達され得る少なくとも3つの他の「非FRET」エネルギー移動プロセスがある。

【0178】

2つの標識が十分に接近して保持されて、1つの標識によって発せられたエネルギーが第2の標識によって受容または吸収され得る場合、FRET機構または非FRET機構にかかわらず、2つの標識は、互いに「エネルギー移動関係」にあると言われ、ここで、プローブの一部に結合したフルオロフォアからの蛍光発光は、プローブの別の部分にある消光剤部分によって消光される（例えば、「Taqaan」検出プローブ化学）。Taqaanプローブのための標識部分には、フルオロフォア、および蛍光消光特性を有する第2の部分（即ち、「消光剤」）が含まれる。この実施形態では、特性シグナルは、特定の波長の蛍光である可能性が高いものの、代替的に可視光シグナルであってもよい。蛍光が関与する場合、発光の変化は、好ましくは、FRETによるものか、または放射エネルギー移動もしくは非FRETモードによるものである。「消光」状態の一对の相互作用標識を

有する検出プローブが適切な周波数の光によって刺激されると、非常に低い場合がある第1のレベルで、蛍光シグナルが発生する。この同じプローブが「非消光」状態にあり、適切な周波数の光によって刺激されると、フルオロフォア部分と消光剤部分とが互いに十分に分離され、それらの間のエネルギー移動が実質的に排除される。その条件下で、消光剤部分は、フルオロフォア部分からの蛍光を消光することができない。フルオロフォアが適切な波長の光エネルギーによって刺激されると、第1のレベルより高い第2のレベルの蛍光シグナルが発生する。2つの蛍光レベル間の差は、検出可能かつ測定可能である。本開示に関連して使用され得るフルオロフォア／消光剤標識ペアの例には、フルオレセイン／テトラメチルローダミン、IAEDANS／フルオレセイン、EDANS／DABCYL、クマリン／DABCYL、フルオレセイン／フルオレセイン、BODIPY FL／BODIPY FL、フルオレセイン／DABCYL、ルシファーイエロー／DABCYL、BODIPY／DABCYL、エオシン／DABCYL、エリスロシン／DABCYL、テトラメチルローダミン／DABCYL、CalOrange／BHQ1、CalRed／BHQ2、Texas Red／DABCYL、CY5／BH1、CY5／BH2、CY3／BH1、CY3／BH2、フルオレセイン／QSY7、FAM／BHQ1、およびQuasar／BHQ2が含まれる。当業者であれば、供与体色素と受容体色素が異なる場合、受容体の増感蛍光の出現または供与体蛍光の消光によって、エネルギー移動が検出され得ることを理解するであろう。供与体種と受容体種が同じである場合、エネルギーは、結果として生じる蛍光偏光解消によって検出され得る。DABCYLおよびQSY7色素などの非蛍光受容体は、直接（即ち、非増感）受容体励起から生じるバックグラウンド蛍光の潜在的な問題を有利に排除する。

【0179】

標識を核酸に結合させ、標識を検出する合成技法および方法は、当該技術分野で周知である（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), Chapter 10、Nelsonらの米国特許第5,658,737号、Woodheadらの米国特許第5,656,207号、Hoganらの米国特許第5,547,842号、Arnoldらの米国特許第5,283,174号、Kourilskyらの米国特許第4,581,333号）、およびBeckerらの欧州特許出願第0 747 706号を参照されたい。

【0180】

キット

本明細書に記載の方法において使用するためのオリゴマーは、キットの調製に好適である。そのようなキットは容器を含んでもよく、各々は、様々なオリゴマーのうちの1つ以上を、任意選択で本明細書に記載の方法を実施するのに必要な試薬（例えば、酵素）のうちの1つ以上とともに有する。キットの構成要素は、濃縮された形態で供給されてもよい。典型的には、キットの構成要素を使用するための一連の説明書も含まれることになる。キットがオリゴマーの組み合わせを含む場合には、個々のオリゴマーは、それらを混合するための適切な説明書を伴う個々の形態、またはすぐに混合できるそれらの組み合わせで提供されてもよい。

【0181】

一態様では、本開示の組成物および任意選択でそれを実施するための一連の説明書を含むキットが提供される。

【0182】

標的配列の検出と診断との相関

個体からの生体試料におけるアデノウイルス、メタニューモウイルス、および／またはライノウイルスに特徴的な増幅された標的配列の検出は、それぞれ、アデノウイルス、メタニューモウイルス、および／またはライノウイルスによる感染を示す。

【実施例】

【0183】

実施例1：ある特定のアデノウイルス増幅プライマーおよびプローブの分析

材料および方法

最初の増幅反応では、次のものを使用した：1倍～2倍濃度のFast Start Master Buffer (Roche)、2単位のFast Start Taq DNAポリメラーゼ (Roche)、100 nMの順方向増幅プライマー（配列番号5）、および100 nMの逆方向増幅プライマー（配列番号6または配列番号8）、および100 nMのプローブ（配列番号10）。

【0184】

総反応量は20マイクロリットルで、反応ごとにアデノウイルスから抽出した5マイクロリットルの鋳型核酸を添加した。対照反応は、鋳型核酸を添加しなかったことを除いて上記のとおり反応をセットアップすることにより実行した。使用した増幅サイクルは、両方の増幅反応セットについて次のとおりであった：光学系をオフにして95℃で600秒間保持；光学系をオフにして95℃で30秒間および光学系をオンにして55℃で60秒間（5サイクル）；光学系をオフにして95℃で10秒間および光学系をオンにして55℃で60秒間（40サイクル）。

【0185】

結果

【表1】

表1：プライマーおよびプローブセットを用いたアデノウイルスの増幅および検出

	配列番号5、6、および10		配列番号5、8、および10	
	C _T	RFU	C _T	RFU
標的／試料	26.9	519	26.4	383

結果をC_T／RFU（サイクル閾値／相対蛍光単位）値として提示し、これらは様々なアデノウイルス血清型を使用した12回の実験の平均を表すものである。対照反応のいずれにおいても増幅は見られなかった。

【0186】

結論

使用したプライマーおよびプローブは、アデノウイルス核酸に高感度かつ特異的であるように見えた。

【0187】

実施例2：さらなるある特定のアデノウイルス増幅プライマーおよびプローブの分析

材料および方法

次の試薬を使用した：1倍～2倍濃度のFast Start Master Buffer (Roche)、2単位のFast Start Taq DNAポリメラーゼ (Roche)、200 nMの順方向増幅プライマー（配列番号11または配列番号12）、および200 nMの逆方向増幅プライマー（配列番号13または配列番号15）、および200 nMのプローブ（配列番号17または配列番号19）。

【0188】

総反応量は20マイクロリットルで、反応ごとにアデノウイルスから抽出した5マイクロリットルの鋳型核酸を添加した。対照反応は、鋳型核酸を添加しなかったことを除いて上記のとおり反応をセットアップすることにより実行した。使用した増幅サイクルは次のとおりであった：光学系をオフにして95℃で600秒間保持；光学系をオフにして95℃で30秒間および光学系をオンにして55℃で60秒間（5サイクル）；光学系をオフにして95℃で10秒間および光学系をオンにして55℃で60秒間（40サイクル）。

【0189】

結果

10

20

30

40

50

【表 2】

表2. プライマーおよびプローブセットを用いたアデノウイルスの増幅および検出

	配列番号11、13、および17		配列番号11、13、および19	
	C _T	RFU	C _T	RFU
標的／試料	8.7	29.8	32	460
	配列番号11、15、および17		配列番号11、15、および19	
	C _T	RFU	C _T	RFU
標的／試料	13.3	29.5	32.3	406.4
	配列番号12、15、および19		配列番号12、15、および17	
	C _T	RFU	C _T	RFU
標的／試料	29.6	620	12.6	32.8
	配列番号12、13、および19		配列番号12、13、および17	
	C _T	RFU	C _T	RFU
標的／試料	29.6	504	8.3	18.9

10

結果をC_T／RFU値として提示し、これらは様々なアデノウイルス血清型を使用した8回の実験の平均を表すものである。対照反応のいずれにおいても増幅は見られなかった。

【0190】

結論

配列番号11、13、および19、配列番号11、15、および19、配列番号12、15、および19、または配列番号12、13、および19の組み合わせは、アデノウイルス核酸に対して高感度および特異性であった。配列番号12の順方向プライマーを含む組み合わせは、配列番号11の順方向プライマーを含む組み合わせよりも良好な感度を有するようである。配列番号12、15、および19を含む組み合わせは、これらの実験で最も感度が高いようであった。

20

【0191】

実施例3：配列番号12、15、および19を使用したアデノウイルス血清型分析

材料および方法

次の試薬を使用した：1倍濃度のFast Start Master Buffer (Roche)、2単位のFast Start Taq DNAポリメラーゼ (Roche)、400 nMの順方向増幅プライマー (配列番号12) および400 nMの逆方向増幅プライマー (配列番号15) を400 nMプローブ (配列番号19) とともに使用。総反応量は20マイクロリットルで、反応ごとにアデノウイルスから抽出した5マイクロリットルの鋳型核酸を添加した。対照反応をセットアップしたが、鋳型核酸の添加はしなかった。使用した増幅サイクルは次のとおりであった：光学系をオフにして95℃で600秒間保持；光学系をオフにして95℃で30秒間および光学系をオンにして55℃で60秒間（5サイクル）；光学系をオフにして95℃で10秒間および光学系をオンにして55℃で60秒間（40サイクル）。

30

【0192】

結果

40

50

【表 3 - 1】

表3. アデノウイルス血清型分析

血清型	C _T	RFU
2-1	26	1203
4-1	31	666
6-1	29	926
7-1	32	605
9-1	26	1137
10-1	28	1252
11-1	28	630
12-1	26	1119
13-1	26	1100
14-1	30	682

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

血清型	C _T	RFU
15-1	26	1078
16-1	29	723
17-1	23	1100
18-1	34	387
19-1	27	1146
20-1	23	996
21-1	31	568
22-1	25	1044
23-1	23	1109
24-1	25	1221
25-1	32	836
26-1	24	1107
27-1	25	1070
28-1	26	989
29-1	27	1116
30-1	22	1166
31-1	21	1127
33-1	28	941
34-1	28	654
35-1	29	542
36-1	24	997
37-1	24	1125
38-1	26	1033
39-1	23	1143
40-1	27	1114
41-1	25	994
42-1	23	1125
43-1	22	1149
44-1	22	1141
45-1	27	1071
46-1	27	1047
47-1	22	1144

10

20

30

40

【表 3 - 3】

血清型	C _T	RFU
48-1	25	1174
49-1	26	1068
50-1	25	672
51-1	26	1099
1-1	29	956
3-1	32	540
5-1	29	791
7A-1	26	632
8-1	34	553
32-2	24	974

10

「血清型番号 - 1 × 10^x TCID₅₀/mL」を反映するように、血清型カラムをセットアップする。C_T値は全て切り捨ててある。結果をC_T/RFU値として提示する。

【0193】

結論

20

配列番号12、15、および19の組み合わせは、試験されたアデノウイルスの全ての血清型を検出することができた。

【0194】

実施例4：配列番号12および15のプライマーを伴うさらなるアデノウイルスプローブの組み合わせの分析

材料および方法

次の試薬を使用した：1倍濃度のFast Start Master Buffer (Roche)、2単位のFast Start Taq DNAポリメラーゼ (Roche)、100nMの順方向増幅プライマー (配列番号12) および100nMの逆方向増幅プライマー (配列番号15) を、150nMプローブ (配列番号21) および50nMプローブ (配列番号24)、100nMプローブ (配列番号21) および100nMプローブ (配列番号24)、50nMプローブ (配列番号21) および150nMプローブ (配列番号24) のいずれかとともに使用。総反応量は20マイクロリットルで、反応ごとにアデノウイルスから抽出した5マイクロリットルの鋳型核酸を添加した。対照反応は、鋳型核酸を添加せずに設定した。使用した増幅サイクルは次のとおりであった：光学系をオフにして95℃で600秒間保持；光学系をオフにして95℃で30秒間および光学系をオンにして55℃で60秒間（5サイクル）；光学系をオフにして95℃で10秒間および光学系をオンにして55℃で60秒間（40サイクル）。

30

【0195】

結果

40

【表 4】

表4:異なる濃度のプローブの組み合わせを使用した増幅および検出

	150nMの配列番号21および 50nMの配列番号24;		100nMの配列番号21および 100nMの配列番号24;	
	C _T	RFU	C _T	RFU
標的	34.8	291	26.9	318
	50nMの配列番号21および 150nMの配列番号24			
	C _T	RFU		
標的	26.8	339		

50

結果を C_T/RFU 値として提示し、これらは様々なアデノウイルス血清型を使用した 6 回の実験の平均を表すものである。

【0196】

結論

配列番号 12 および 15 と組み合わせた配列番号 21 のプローブおよび配列番号 24 のプローブは、試験した様々な濃度でアデノウイルスを高感度かつ特異的に検出することができた。

【0197】

実施例 5：アデノウイルスの検出のためのさらなるプローブおよびプライマーの組み合わせの分析

材料および方法

次の試薬を使用した：

1 倍濃度の Fast Start Master Buffer (Roche)、2 単位の Fast Start Taq DNA ポリメラーゼ (Roche)、および以下のいずれか：(i) 50 mM の順方向増幅プライマー (配列番号 25)、50 mM の順方向増幅プライマー (配列番号 26)、50 mM の逆方向増幅プライマー (配列番号 27)、50 mM の逆方向増幅プライマー (配列番号 28)、および 100 nM のプローブ (配列番号 21 および配列番号 23)；(ii) 50 mM の順方向増幅プライマー (配列番号 26)、50 mM の逆方向増幅プライマー (配列番号 27)、50 mM の逆方向増幅プライマー (配列番号 28)、および 100 nM のプローブ (配列番号 21 および配列番号 23)；(iii) 50 mM の順方向増幅プライマー (配列番号 25)、50 mM の逆方向増幅プライマー (配列番号 27)、50 mM の逆方向増幅プライマー (配列番号 28)、および 100 nM のプローブ (配列番号 21 および配列番号 23)；(iv) 50 mM の順方向増幅プライマー (配列番号 25)、50 mM の順方向増幅プライマー (配列番号 26)、50 mM の逆方向増幅プライマー (配列番号 28)、および 100 nM のプローブ (配列番号 21 および配列番号 23)；(v) 50 mM の順方向増幅プライマー (配列番号 25)、50 mM の順方向増幅プライマー (配列番号 26)、50 mM の逆方向増幅プライマー (配列番号 27)、50 mM の逆方向増幅プライマー (配列番号 28)、および 100 nM のプローブ (配列番号 21 および配列番号 23)；または (vi) 50 mM の順方向増幅プライマー (配列番号 25)、50 mM の順方向増幅プライマー (配列番号 26)、50 mM の逆方向増幅プライマー (配列番号 27)、50 mM の逆方向増幅プライマー (配列番号 28)、および 100 nM のプローブ (配列番号 21)。

【0198】

総反応量は 20 マイクロリットルで、反応ごとにアデノウイルスから抽出した 5 マイクロリットルの鋳型核酸を添加した。2 つの異なる濃度を試験した。

【0199】

使用した増幅サイクルは次のとおりであった：光学系をオフにして 95℃ で 600 秒間保持；光学系をオフにして 95℃ で 30 秒間および光学系をオンにして 55℃ で 60 秒間 (5 サイクル)；光学系をオフにして 95℃ で 10 秒間および光学系をオンにして 55℃ で 60 秒間 (40 サイクル)。

【0200】

結果

表 5 a ~ 5 d . 異なる濃度およびプライマーとプローブとの組み合わせを使用した増幅および検出

10

20

30

40

50

【表 5 a】

表5a.

	配列番号25、26、27、28、21、および23		配列番号26、27、28、21、および23	
	C _T	RFU	C _T	RFU
標的(10 ¹)	38.5	240	39.2	143
標的(10 ³)	29.8	373	30.8	227

【表 5 b】

表5b.

	配列番号25、27、28、21、および23		配列番号25、26、28、21、および23	
	C _T	RFU	C _T	RFU
標的(10 ¹)	37.8	212	41.5	99
標的(10 ³)	30.2	275	32	258

【表 5 c】

表5c.

	配列番号25、26、27、21、および23		配列番号25、26、27、28、および23	
	C _T	RFU	C _T	RFU
標的(10 ¹)	41.8	96	37.7	254
標的(10 ³)	31.8	320	30	360

【表 5 d】

表5d.

	配列番号25、26、27、28、および21	
	C _T	RFU
標的 (10 ¹)	7.1	21
標的 (10 ³)	0	3

結果を R F U 値として提示し、これらは各濃度についての 6 回の実験の平均を表すものである。

【 0 2 0 1】

結論

アッセイからプライマーまたはプローブのうちの 1 つを除外しても、大部分でほとんど違いはなかった。しかし、プローブ配列番号 2 3 を省略すると、この特定の実験においては検出が低下した。

【 0 2 0 2】

実施例 6：アデノウイルス 1 8 を検出するためのプライマーおよびプローブ組み合わせの分析

材料および方法

次の試薬を使用した：1 倍濃度の F a s t S t a r t M a s t e r B u f f e r (R o c h e)、3 単位の F a s t S t a r t T a q D N A ポリメラーゼ (R o c h e)、1 5 0 n M 順方向増幅プライマー（配列番号 2 5 および配列番号 2 6）および 1 5 0

10

20

30

40

50

nM逆方向増幅プライマー（配列番号27および配列番号28）を300nMプローブ（配列番号29）とともに使用。総反応量は20マイクロリットルで、反応ごとにアデノウイルス18から抽出した5マイクロリットルの鋳型核酸を添加した。使用した増幅サイクルは次のとおりであった：光学系をオフにして95℃で600秒間保持；光学系をオフにして95℃で30秒間および光学系をオンにして55℃で60秒間（5サイクル）；光学系をオフにして95℃で10秒間および光学系をオンにして55℃で60秒間（40サイクル）。

【0203】

結果

【表6】

表6. アデノウイルス18の増幅および検出

血清型	C _T	RFU
18-6	17	1240
18-5	20	975
18-4	24	1242
18-3	30	1023
18-2	33	942
18-1	35	747
18-0	31	1215

「血清型番号-1×10^x TCID₅₀/mL」を反映するように、血清型カラムをセットアップする。C_T値は全て切り捨ててある。結果をC_T/RFU値として提示する。

【0204】

結論

プライマーおよびプローブのこの組み合わせにより、アデノウイルス18が首尾よく検出される。

【0205】

実施例7：アデノウイルスを検出するためのさらなるプライマーおよびプローブの組み合わせの分析

材料および方法

次の試薬を使用した：1倍濃度のFast Start Master Buffer（Roche）、3単位のFast Start Taq DNAポリメラーゼ（Roche）、150nM順方向増幅プライマー（配列番号31および配列番号26）および150nM逆方向増幅プライマー（配列番号27および配列番号28）を150nMプローブ（配列番号21および配列番号23）とともに使用。総反応量は20マイクロリットルで、反応ごとに様々なアデノウイルス血清型から抽出した5マイクロリットルの鋳型核酸を添加した。使用した増幅サイクルは次のとおりであった：光学系をオフにして95℃で600秒間保持；光学系をオフにして95℃で30秒間および光学系をオンにして55℃で60秒間（5サイクル）；光学系をオフにして95℃で10秒間および光学系をオンにして55℃で60秒間（40サイクル）。

【0206】

結果

10

20

30

40

50

【表 7】

表7. 様々なアデノウイルス血清型を検出するためのプライマーおよびプローブの組み合わせ

血清型	FAM		Cy5	
	C _T	RFU	C _T	RFU
1	38.7	40	35.9	172
3	37.4	59	35.5	208
4	0	22	37.2	185
7	32.2	711	32	209
11	24.2	843	32.2	190
14	28.8	737	31.9	196
16	23.8	879	32.1	212
21	31.9	671	31.4	219
25	32.8	399	31.7	217
34	29.3	645	31.7	205
35	29.6	771	30.7	220
50	24.6	786	30.9	210

結果を C_T / R F U 値として提示する。F a m チャンネルは、鋳型核酸の検出結果を示す。C y 5 チャンネルは、内部対照核酸の検出結果を示す。

【0207】

結論

血清型 4 を除き、このプライマーおよびプローブの組み合わせにより、試験した血清型の全てが首尾よく検出された。

【0208】

実施例 8：アデノウイルスを検出するためのさらなるプライマーおよびプローブの組み合わせの分析

材料および方法

次の試薬を使用した：1 倍濃度の F a s t S t a r t M a s t e r B u f f e r (R o c h e)、3 単位の F a s t S t a r t T a q D N A ポリメラーゼ (R o c h e)、および以下のいずれか：(i) 1 5 0 n M 順方向増幅プライマー（配列番号 3 3 および 3 4）および 1 5 0 n M 逆方向増幅プライマー（配列番号 2 7 および配列番号 2 8）を 1 5 0 n M プローブ（配列番号 2 1 および配列番号 2 3）とともに使用；(i i) 1 5 0 n M 順方向増幅プライマー（配列番号 3 3 および 3 5）および 1 5 0 n M 逆方向増幅プライマー（配列番号 2 7 および配列番号 2 8）を 1 5 0 n M プローブ（配列番号 2 1 および配列番号 2 3）とともに使用；または (i i i) 1 5 0 n M の順方向増幅プライマー（配列番号 3 4 および 3 5）および 1 5 0 n M の逆方向増幅プライマー（配列番号 2 7 および配列番号 2 8）を 1 5 0 n M のプローブ（配列番号 2 1 および配列番号 2 3）とともに使用。総反応量は 2 0 マイクロリットルで、反応ごとに様々なアデノウイルス血清型から抽出した 5 マイクロリットルの鋳型核酸を添加した。使用した増幅サイクルは次のとおりであった：光学系をオフにして 9 5 °C で 6 0 0 秒間保持；光学系をオフにして 9 5 °C で 3 0 秒間および光学系をオンにして 5 5 °C で 6 0 秒間（5 サイクル）；光学系をオフにして 9 5 °C で 1 0 秒間および光学系をオンにして 5 5 °C で 6 0 秒間（4 0 サイクル）。

【0209】

結果

表 8 a ~ 8 c . プライマーおよびプローブの組み合わせを使用した様々なアデノウイルス

ス血清型の増幅および検出

【表 8 a】

表8a.

	配列番号33、34、27、28、21、および23			
	FAM		Cy5	
血清型	C _T	RFU	C _T	RFU
1	35.6	318	35.9	243
3	37.3	87	35.8	210
4	36.9	150	35.6	232
19	38.1	95	35.2	217
31	35.7	247	34.6	257
41	36.7	244	35.9	285
14	29.7	868	31.5	250

10

【表 8 b】

表8b.

	配列番号33、35、27、28、21、および23			
	FAM		Cy5	
血清型	C _T	RFU	C _T	RFU
1	0	12	35.7	248
3	36.4	159	35.1	231
4	36.8	171	35.6	249
19	36.7	151	35.3	181
31	35.8	170	34.6	197
41	39.3	50	36	243
14	29.2	1062	31.5	256

20

30

【表 8 c】

表8c

	配列番号34、35、27、28、21、および23			
	FAM		Cy5	
血清型	C _T	RFU	C _T	RFU
1	37.5	198	35.5	199
3	0	5	35.5	213
4	0	15	36.1	158
19	0	12	35.1	224
31	35.6	369	34.6	240
41	36.6	284	35.7	263
14	33.1	942	32.1	203

40

結果を C_T および R F U 値として提示する。F a m チャンネルは、鋳型核酸の検出結果を

50

示す。Cy5チャンネルは、内部対照核酸の検出結果を示す。

【0210】

結論

表8aのプライマーおよびプローブにより、試験した血清型の全てが首尾よく検出された。表8bおよび8cにより、試験した大部分の血清型が検出された。

【0211】

実施例9：アデノウイルスを検出するためのさらなるプライマーおよびプローブの組み合わせの分析

材料および方法

次の試薬を使用した：1倍濃度のFast Start Master Buffer (Roche)、3単位のFast Start Taq DNAポリメラーゼ (Roche)、ならびに150 nMの順方向増幅プライマー（配列番号25および26）および150 nMの逆方向増幅プライマー（配列番号27および配列番号28）を150 nMプローブ（配列番号36および配列番号37）とともに使用。総反応量は20マイクロリットルで、アデノウイルス19血清型陽性対照プラスミドから抽出した5マイクロリットルの鋳型核酸を6つの異なる濃度で反応ごとに添加した。使用した増幅サイクルは次のとおりであった：光学系をオフにして95℃で600秒間保持；光学系をオフにして95℃で30秒間および光学系をオンにして55℃で60秒間（5サイクル）；光学系をオフにして95℃で10秒間および光学系をオンにして55℃で60秒間（40サイクル）。

【0212】

結果

【表9】

表9. 標的核酸の連続希釈物の増幅および検出

濃度	FAM	
	C _T	RFU
10 ⁴	28.1	1127
10 ⁴	28.2	1040
10 ⁴	28	1196
10 ³	31.9	938
10 ³	32.1	922
10 ³	32.3	969
10 ²	35.3	865
10 ²	35.4	800
10 ²	35.2	800
10 ¹	37.8	571
10 ¹	33.6	59
10 ¹	38.6	419
10 ⁰	0	10
10 ⁰	0	0
10 ⁰	0	0
10 ⁻¹	0	0
10 ⁻¹	0	0
10 ⁻¹	0	0

結果をC_T/RFU値として提示する。

【0213】

結論

これらのプライマーおよびプローブにより、対照試験したアデノウイルス19血清型が首尾よく検出された。

【0214】

実施例10：実施例9からのプライマーおよびプローブの組み合わせのさらなる分析

材料および方法

次の試薬を使用した：1倍濃度のFast Start Master Buffer (Roche)、3単位のFast Start Taq DNAポリメラーゼ (Roche)、ならびに150 nMの順方向増幅プライマー（配列番号25および26）および150 nMの逆方向増幅プライマー（配列番号27および配列番号28）を150 nMプローブ（配列番号36および配列番号37）とともに使用。総反応量は、様々なアデノウイルス血清型から抽出した5マイクロリットルの鋳型核酸を伴って20マイクロリットルであり、 3×10^0 の濃度で試験した。使用した増幅サイクルは次のとおりであった：光学系をオフにして95℃で600秒間保持；光学系をオフにして95℃で30秒間および光学系をオンにして55℃で60秒間（5サイクル）；光学系をオフにして95℃で10秒間および光学系をオンにして55℃で60秒間（40サイクル）。

【0215】

結果

10

20

30

40

50

【表 10 - 1】

表10. アデノウイルス標的核酸の増幅および検出

血清型	C _T	RFU
2	31.6	1465
5	33.9	903
6	0	0
7	39	366
8	37.4	625
9	32	1223
10	36.3	837
11	26.6	950
12	31.8	1176
13	29.7	1487
14	34	671
15	33.5	1018
16	33.4	729
17	30.2	1622
18	40	175
20	27.2	1217
21	34.1	733
22	31.2	1150
23	30.1	1471
24	33.2	1110
25	37.3	661
26	29.1	1814
27	29.5	1637

10

20

30

40

50

【表 10-2】

血清型	C _T	RFU
28	34.2	1032
29	32.9	1159
30	28.4	1496
32	26.6	2079
33	33.9	1017
34	34.2	690
35	33.1	702
36	29.1	1312
37	30.2	1393
38	31.8	1202
39	30	1650
40	32.6	1290
42	29.1	1261
43	28.8	1832
44	23.3	1218
45	32.1	1289
46	32.5	1183
47	26.4	1209
48	29.4	1565
49	31.5	1264
50	32	846
51	31.4	1125

結果を C_T および R F U 値として提示する。

【0216】

考察

血清型 6 を除いて、試験した血清型の全てがこのプライマーおよびプローブ濃度を使用して検出された。この血清型は、 3×10^1 T C I D₅₀/mL 以上で首尾よく検出された。

【0217】

実施例 11. アデノウイルスおよびヒトメタニューモウイルスおよびライノウイルスの多重増幅および検出

材料および方法

分析感度および反応性：アデノウイルス、ヒトメタニューモウイルス、およびライノウイルスの増幅および検出用のプライマーおよびプローブを含有する P C R 製剤を、以下を（反応ごとに）含むように調製した：15 u L の S u p e r m i x（11.1 単位 T a q）、1.2 u L の M M L V 逆転写酵素（R T）（24 単位）、2.0 u L の P r i m e r P r o b e M i x、0.084 u L の 0.5 M E D T A、および 1.716 u L の水。（A M R 製剤。）標的核酸をある数のストック微生物¹から抽出し、各微生物について、0.1 T C I D₅₀/mL、1 T C I D₅₀/mL、および 10 T C I D₅₀/mL に希釈した。各希釈液からの 10 u L の標的核酸溶出液を、反応体積の P C R 製剤と個別に組み合わせ、30 u L の合計反応体積にした。この実験で使用したプライマーおよびプロ

ープは、内部対照を含む配列番号48～49および51～74に示される。この例で使用したプローブは、消光剤およびフルオロフォアを含む二重標識プローブであった。

¹標的核酸は、TriCore Reference Laboratories (Albuquerque, NM)、ZeptoMetrix Corporation (Buffalo, NY)、およびATCC (Manassas, VA) から入手した事前に特性評価されたストック微生物から単離した。

【0218】

試料の調製にはPanther機器 (Hologic, Inc., San Diego, CA) を使用し、リアルタイムの増幅および検出には卓上PCR熱循環器を使用して、多重リアルタイムPCR反応をセットアップした。検出反応には、Taqman (商標) (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, CA) 化学を使用した。熱循環器中、アデノウイルス標的核酸をROXチャンネルで検出し、hMPV核酸をHEXチャンネルで検出し、HRV核酸をFAMチャンネルで検出し、内部対照をRED677チャンネルで検出した。アッセイは、既知の濃度の各ウイルス標的を10反復で使用して実施した。各個々の試料調製は、卓上PCR熱循環器上で1つのリアルタイムRT-PCR反復として評価した。バックグラウンドを差し引いた曲線を使用して、陽性または陰性の決定を行った。表11～表13は、10TCID₅₀/mL以下のウイルス濃度での100%ヒット率を示す。

【0219】

これらの研究に続いて、プライマー配列番号75の5'末端に2つの追加の塩基を付加して、プライマー配列番号50を生成した。ライノウイルス感度アッセイは、配列番号75の代わりに配列番号50を用いて上記のとおりを実施し、結果は表14に提示する。

【表11】

表11: AdV/hMPV/RVを組み合わせたオリゴヌクレオチド配合物を使用したライノウイルス検出

ライノウイルス	濃度 (TCID ₅₀ /ml)	ヒット率パーセント(n=10)	Ct平均	Ct標準偏差	RFU	RFU標準偏差
ライノウイルス A-18	10 ⁰	100%	34.2	0.4	14828	4048
ライノウイルス B-26	10 ⁰	100%	35.1	0.4	4641	662

【表12】

表12: AdV/hMPV/RVを組み合わせたオリゴヌクレオチド配合物を使用したhMPV検出

hMPV	濃度 (TCID ₅₀ /ml)	ヒット率パーセント(n=10)	Ct平均	Ct標準偏差	RFU	RFU標準偏差
hMPV A1-16	10 ¹	100%	37.7	0.6	3019	630
hMPV A2-20	10 ¹	100%	34.8	0.3	6186	583
hMPV B1-3	10 ¹	100%	35.8	1.0	5818	1357
hMPV B2-8	10 ¹	100%	34.1	0.4	8043	1206

【表 1 3】

表13:AdV／hMPV／RVを組み合わせたオリゴヌクレオチド配合物を使用したアデノウイルス検出

アデノウイルス	濃 度 (TCID50/ml)	ヒット率 パーセント (n=10)	Ct平均	Ct標準偏差	RFU	RFU標準偏差
AdV 1 (種C)	10 ⁻¹	100%	38.1	0.8	2919	921
AdV 3 (種B)	10 ⁰	100%	36.1	0.3	5809	1157
AdV 4 (種E)	10 ⁻³	100%	37.9	1.9	2738	965
AdV 9 (種D)	10 ⁻¹	100%	37.6	0.7	2786	831
AdV 12 (種A)	10 ⁻¹	100%	36.4	0.8	2186	549
AdV 40 (種F)	10 ⁰	100%	38.5	1.4	2320	1184

10

20

【表 1 4】

表14:配列番号74を含むAdV／hMPV／RVを組み合わせたオリゴヌクレオチド配合物を使用したライノウイルスB検出

ライノウイルス	濃 度 (TCID50/ml)	ヒット率 パーセント (n=10)	Ct平均	Ct標準偏差	RFU	RFU標準偏差
ライノウイルス B-26	10 ⁰	100%	36.4	0.3	7509	1459

30

【 0 2 2 0】

結論：

この総括で提示した増幅および検出オリゴヌクレオチドの多重化された組み合わせは、10 TCID₅₀/mL以下のウイルス濃度を検出することができる。

【 0 2 2 1】

実施例 1 2 . 多重増幅および検出アッセイを使用した臨床検体検出および臨床的特異性材料および方法

実施例 1 1 で上に列挙したプライマーおよびプローブの全てを含むPCR製剤（AMR製剤）（配列番号 7 4 を使用）を使用して、ライノウイルス陽性、hMPV陽性、および／もしくはアデノウイルス陽性、または3つ全てのウイルスについて陰性であると市販のアッセイによって同定された臨床検体を試験した。市販のアッセイには、BioFire FilmArray RVP Respiratory Panel (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT)、GenMark e Sensor Respiratory Virus Panel (RVP) (GenMark Diagnostics, Inc., Carlsbad, CA)、およびLumi

40

50

nex xTAG Respiratory Virus Panel (Luminex Corporation, Austin, TX) が含まれる。全ての試料は、Panther 機器を使用して抽出し、PCR 循環は、上記の卓上 PCR 熱循環機器上で実施した。AMR アッセイにより、既に特徴付けた臨床検体から、HRV、hMPV、およびアデノウイルスを検出し、一致は、HRV で 94.8% (164/173)、hMPV で 97.2% (279/287)、アデノウイルスで 93.2% (466/500) であった。AMR アッセイでは、88 の臨床検体のうち 86 が陰性であると同定され、参照アッセイ (Luminex xTAG Respiratory Virus Panel) と 97.7% の一致が得られた。加えて、内部対照は、全ての臨床的に陰性の検体に対して有効であった。AMR 製剤アッセイを使用して得た 2 つの「偽陽性」結果は、GenMark eSensor RVP アッセイおよび Prodesse ProAdeno+Assay (Hologic, Inc., San Diego, CA) を使用して真陽性であると判断した。したがって、Luminex アッセイで誤って陰性と同定された臨床検体を除去すると、AMR アッセイによって 100% の一致が示された (86/86)。

【0222】

結論：

この実施例で提示した増幅および検出オリゴヌクレオチドの多重化された組み合わせは、臨床検体中のウイルス標的を検出することができ、競合アッセイ (competitor assay) との良好な一致を示す。

【0223】

特異性

材料および方法

実施例 11 に列举したプライマーおよびプローブの全てを含む PCR 製剤 (AMR 製剤) (配列番号 74 を使用して) を、他の微生物との交差反応性について評価した。これらの微生物は、アデノウイルス、hMPV、および HRV のうちの 1 つ以上の有無についてクリニックで試験される検体種 (鼻咽頭および下気道検体) で一般的に見られるものである。微生物を、プールして試験するか、または個別に試験した (表 15 の AMR パネル 1 ~ 26 を参照)。各パネルからの 3 つの反復を Panther 機器上で個別に処理し、PCR 循環を上記の卓上 PCR 熱循環機器上で実施した。表 15 は、AMR 製剤 (AMR 24 ~ 26) の標的となるウイルスのみが検出されたことを示す。アッセイ (AMR 1 ~ 23) で標的とされていない微生物との交差反応性は観察されなかった。

【表 15-1】

表 15: AMR 製剤特異性パネルの微生物および濃度²

パネル	微生物	試験濃度	交差反応性結果
AMR 1	Acinetobacter baumannii 307-0294	1x10 ^{7.6} CFU/ml	観察されず
	コロナウイルス 229E	1x10 ^{4.0} TCID ₅₀ /ml	観察されず

² 標的核酸は、TriCore Reference Laboratories (Albuquerque, NM)、ZeptoMetrix Corporation (Buffalo, NY)、および ATCC (Manassas, VA) から入手した事前に特性評価されたストック微生物から単離した。

10

20

30

40

50

【表 15 - 2】

	Bordetella parapertussis	1x10 ^{7.2} CFU/ml	観察されず
	Burkholderia cepacia Z066	1x10 ^{8.0} CFU/ml	観察されず
	Candida albicans Z006	1x10 ^{6.5} CFU/ml	観察されず
	Chlamydia pneumoniae	1x10 ^{5.8} CFU/ml	観察されず
AMR 2	Bordetella pertussis	1x10 ^{7.6} CFU/ml	観察されず
	カンジダグラブラタZ Z007	1x10 ^{6.9} CFU/ml	観察されず
	クラミジアトラコマチス	1x10 ^{5.8} CFU/ml	観察されず
	コリネバクテリウムジフテリアZ116	1x10 ^{7.9} CFU/ml	観察されず
	コロナウイルスNL63	1x10 ^{3.5} TCID50/ml	観察されず
	サイトメガロウイルスAD-169、 MRC-5	1x10 ^{3.9} TCID50/ml	観察されず
AMR 3	E. coli ETEC; ST+, LT+	1x10 ^{7.8} CFU/ml	観察されず
	HPIV-1	1x10 ^{3.7} TCID50/ml	観察されず
	HSV-1 Macinytre 株	1x10 ^{5.8} TCID50/ml	観察されず
	コロナウイルスOC43	1x10 ^{5.3} TCID50/ml	観察されず
	IA/California/07/2009 2009 H1N1	1x10 ^{3.5} TCID50/ml	観察されず
	Lactobacillus acidophilus Z048	1x10 ^{6.7} CFU/ml	観察されず
AMR 4	HPIV-2	1x10 ^{5.6} TCID50/ml	観察されず

10

20

30

40

50

【表 15 - 3】

	Neisseria elongata Z071	1x10 ^{8.1} CFU/ml	観察されず
	RSV A	1x10 ^{6.1} TCID50/ml	観察されず
	IA/Massachusetts/15/13 2009 H1N1	1x10 ^{3.4} TCID50/ml	観察されず
	Legionella pneumophila Philadelphia	1x10 ^{8.5} CFU/ml	観察されず
	マイコバクテリウム細胞内溶解物	1x10 ^{5.6} CFU/ml	観察されず
AMR 5	HPIV-3	1x10 ^{6.1} TCID50/ml	観察されず
	HSV-2 Type 2G型株	1x10 ^{4.8} TCID50/ml	観察されず
	IA/Victoria/361/2011	1x10 ^{3.5} TCID50/ml	観察されず
	Staphylococcus aureus MSSA	1x10 ^{7.9} CFU/ml	観察されず
	エプスタインバーウイルスB95-8	1x10 ^{6.8} コピー/ml	観察されず
	Haemophilus Influenzae b型 ; Eagan	1x10 ^{7.2} CFU/ml	観察されず
AMR 6	HPIV-4a	1x10 ^{4.0} TCID50/ml	観察されず
	IA/Switzerland/9715293/2013 H3N2	1x10 ^{3.4} TCID50/ml	観察されず
	Mycoplasma pneumoniae M129	1x10 ^{6.1} CFU/ml	観察されず
	Streptococcus pyogenes Z018	1x10 ^{7.7} CFU/ml	観察されず
	Staphylococcus haemolyticus Z067	1x10 ^{7.3} CFU/ml	観察されず
	Lactobacillus plantarum 17-5	1x10 ^{7.2} CFU/ml	観察されず

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 4】

AMR 7	Legionella micdadei Tatlock	$1 \times 10^{7.7}$ CFU/ml	観察されず
	IB/Brisbane/33/08	$1 \times 10^{3.45}$ TCID50/ml	観察されず
	Staphylococcus epidermidis MRSE	$1 \times 10^{7.8}$ TCID50/ml	観察されず
	Streptococcus agalactiae	$1 \times 10^{7.2}$ CFU/ml	観察されず
	Klebsiella pneumonia Z026	$1 \times 10^{8.1}$ CFU/ml	観察されず
AMR 8	麻疹ウイルス	$1 \times 10^{3.7}$ TCID50/ml	観察されず
	Moraxella catarrhalis Ne 11	$1 \times 10^{5.3}$ CFU/ml	観察されず
	IB/Massachusetts/2/2012	$1 \times 10^{3.5}$ TCID50/ml	観察されず
	Streptococcus pneumoniae	$1 \times 10^{6.2}$ CFU/ml	観察されず
	流行性耳下腺炎ウイルス11	$1 \times 10^{4.3}$ TCID50/ml	観察されず
AMR 9	Mycobacterium tuberculosis 溶解物	$1 \times 10^{5.4}$ TCID50/ml	観察されず
	Neisseria meningitidis A	$1 \times 10^{7.2}$ CFU/ml	観察されず
	Mycoplasma hominis	$1 \times 10^{3.3}$ CFU/ml	観察されず
	RSV B	$1 \times 10^{6.4}$ TCID50/ml	観察されず
	Streptococcus salivarius	$1 \times 10^{6.7}$ CFU/ml	観察されず
AMR 10	Pseudomonas aeruginosa Z139	$1 \times 10^{8.3}$ CFU/ml	観察されず
	Serratia marcescens Z053	$1 \times 10^{7.9}$ CFU/ml	観察されず

10

20

30

40

50

【表 15 - 5】

	Streptococcus sanguinis Z089	1x10 ^{7.3} CFU/ml	観察されず
	Ureaplasma urealyticum	1x10 ^{8.0} CFU/ml	観察されず
	水痘帯状ヘルペスウイルス Ellen	1x10 ^{3.5} TCID50/ml	観察されず
AMR 11	コクサッキーB3	1x10 ^{6.6} TCID50/ml	観察されず
AMR 12	コクサッキーB4	1x10 ^{3.8} TCID50/ml	観察されず
AMR 13	コクサッキーB5/10/2006	1x10 ^{5.8} TCID50/ml	観察されず
AMR 14	コクサッキーウイルスA10	1x10 ^{3.7} TCID50/ml	観察されず
AMR 15	コクサッキーウイルスA21	1x10 ^{3.9} TCID50/ml	観察されず
AMR 16	エコーウイルス6	1x10 ^{6.3} TCID50/ml	観察されず
AMR 17	エンテロウイルス11	1x10 ^{6.8} TCID50/ml	観察されず
AMR 18	エンテロウイルス2	1x10 ^{6.8} TCID50/ml	観察されず
AMR 19	エンテロウイルス3	1x10 ^{4.8} TCID50/ml	観察されず
AMR 20	エンテロウイルス68	1x10 ^{2.8} TCID50/ml	観察されず
AMR 21	エンテロウイルス70	1x10 ^{3.8} TCID50/ml	観察されず
AMR 22	エンテロウイルス71	1x10 ^{6.2} TCID50/ml	観察されず
AMR 23	ポリオウイルス1	1x10 ^{6.3} TCID50/ml	観察されず
AMR 24	アデノウイルス1	1x10 ^{6.3} TCID50/ml	17.3 AdV Ct

10

20

30

40

50

【表 15 - 6】

	hMPV-3サブタイプB1	1x10 ^{6.1} TCID50/ml	22.9 hMPV Ct
	ライノウイルス1A	1x10 ^{4.4} TCID50/ml	22.5 RV Ct
AMR 25	アデノウイルス4	1x10 ^{3.7} TCID50/ml	21.4 AdV Ct
	hMPV-9サブタイプA1	1x10 ^{7.5} TCID50/ml	19.1 hMPV Ct
	ライノウイルス26B	1x10 ^{3.7} TCID50/ml	24.0 RV Ct
AMR 26	アデノウイルス7a	1x10 ^{5.6} TCID50/ml	16.9 AdV Ct

Ct=サイクル時間

【0224】

結論：

この総括で提示した増幅および検出オリゴヌクレオチドの多重化された組み合わせは、AdV／hMPV／RVアッセイの標的に対する特異性を呈する。

【0225】

実施例11で上述したように、続いて、配列番号50を多重化試薬中で配列番号75により置換した。この修飾したPCR反応製剤を、臨床試料およびチャレンジ微生物を使用した増幅および検出反応において試験した。修飾したAMR製剤は、この実施例12に示したものと類似した結果をもたらした（データ割愛）。

【0226】

例示的な核酸配列

本表16は、本開示で有用な例示的な配列を提供する。この表は開示の範囲を制限するものではない。配列は、世界知的所有権機関（WIPO）のHandbook on Industrial Property Information and Documentation, Standard ST. 25（1998）（付録2の表1～6を含む）に準拠して提示する。

10

20

30

40

50

【表 16 - 1】

表16. 例示的な核酸配列

配列番号	配列5'から3'
1	CAGGACGCCTCGGRGTAYCTSAG
2	GGAGCCACVGTGGGRTT
3	AAYCCCACBGTGGCTCC
4	CCGGGTCTGGTGCAGTTTGCCCGC
5	CACATCGCCGGACAGGA
6	CATACTGAAGTAGGTGTCTGT
7	ACAGACACCTACTTCAGTATG
8	CGGTGGTCACATCGTGG
9	CCACGATGTGACCACCG
10	AGTACCTCAGTCCGGGTCTGGTG
11	ATGGCTACCCCTTCGATG
12	ACCCCMTCGATGATGCC
13	GCGGGCGAATTGCACCA
14	TGGTGCAATTCGCCCGC
15	GCGGGCAAAYTGCACCA
16	TGGTGCAATTTGCCCGC
17	GACTCAGGTACTCCGAAGCATCCT
18	AGGATGCTTCGGAGTACCTGAGTC
19	CTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT
20	AGGACGCCTCGGAGTACCTGAG
21	CTCAGGTACTCCGAAGCATCCT
22	AGGATGCTTCGGAGTACCTGAG

10

20

30

40

50

【表 16 - 2】

23	CAGGTACTCCGAGGCGTCCT
24	AGGACGCCTCGGAGTACCTG
25	ACCCCATCGATGATGCC
26	ACCCCTCGATGATGCC
27	GCGGGCAAACGACCA
28	GCGGGCAAATTGACCA
29	CTCAGGTATTCCGAGGCATCCT
30	AGGATGCCTCGGAATACCTGAG
31	ACCCCATCGATGCTGCC
32	ACCCCATCGATGATGCC
33	TGGGCGTACATGCACATC
34	GTGGTCTTACATGCACATC
35	GTGGGCATACATGCACATC
36	AGGATGCTTCGGAGTACCTGAG
37	AGGACGCCTCGGAGTACCTG
38	ARTGGKCDTACATGCACATC
39	CAGGACGCCTCGGAGTACCT
40	AGGATGCTTCGGAGTACCTGAG
41	CACGATGTGACCACAGA
42	CAYGATGTGACCACAGA
43	CACGAYGTGACCACAGA
44	CACGATGTGACCACSGA
45	CACGATGTGACCACVGA
46	CAYGAYGTGACCACVGA
47	ヘキサンのヒトアデノウイルス9遺伝子、完全 cds AB AB330090.1およびgi番号GI:190356540
48	AGCCTGCGTGGCGGCCA
49	AGCCUGCGTGGTGGCCUGCC
50	CACTAGTUTGGTCGATGAGGCT
51	CCATCTGTAGATTAGGGUAATGAGGCT
52	CCCAACTTTGCAAGTGTTGTTCTCGG
53	CCCCAATTTGCTAGTGTTGTTCTTGG
54	CCUGCGTGGCTGCCTGC

10

20

30

40

50

【表 16 - 3】

55	CGTCGACCGAAGTCCTGCAAAAGGTCAC
56	CTGCTGCTGAAAATAGTTCTGTGTTTGG
57	GAAACACGGACACCCAAAGTAGT
58	GGCCTCTGCTAAAGCAACACC
59	GTAGATCGGGGCAATGGGGCT
60	GTAGATCGGGGTAATGGGGCT
61	GTGGCGCGGGCGAACTGC
62	GTTGCACGGGCGAACTGC
63	TACATGCACATCGCCGGGCAGGA
64	TACATGCACATCTCGGGCCAGGA
65	TAGACCTGGCAGATGAGGC
66	TGCCCGCAGAACGTTGCGAA
67	TGCCTCAGGCTTAGGCATAATAGGTATGTATCG
68	TGCTGCAGAAAATAGCTCTGTGTTTGG
69	TGCTTCAGGTCTAGGTATAATCGGAATGTACAG
70	TGCTTCAGGTTTAGGCATAATCGGAATGTACAG
71	TGGCCACTCCGTCGATGATG
72	TGGCTACCCCATCGATGATG
73	TGGCTACCCCATCGATGCTG
74	TGGCTACCCCATCGATGATG
75	CTAGTUTGGTCGATGAGGCT
76	ヒトライノウイルスC分離株Resp_4051/07 5' UTR。HM581865.1 GI:302378331
77	CCATCTGTAGRTYRGGGYAATGRGGCTAC
78	GTAGATTAGGGUAATGAGGCTAC
79	GTAGATTAGGGUAATGAGGCT
80	GTAGATCRGGGUAATGGGGCT
81	GTAGATCRGGGYAATGGGGCT
82	GTAGATCRGGGUAATGRGGCT
83	GTAGATCGGGGTAATGGGGCTAC
84	GTAGATCGGGGCAATGGGGCTAC
85	GTAGATCRGGGYAATGRGG
86	GTAGATCRGGGYAATGRGGCTAC

10

20

30

40

50

【表 16 - 4】

87	AGCCTGCGTGGYKSCCW RCC	
88	AGCCYGC GTGGTGCCCYGCC	
89	CUGCGTGGTGCCCYGCC	
90	CYGCGTGGTGCCCU GCC	
91	AGCCYGC GTGGTG C	
92	AGCCTGCGTGGCGGCCA	
93	AGCCYGC GTGGTGCC C	
94	CCUGCGTGGCTGCCTGC	10
95	GRTTAGCCRCATT CAGGGGCCGGAGGA	
96	GAAACACGGACACCCAAAGTAGTYGGTYCCRTCCC	
97	AAGTAGTTGGTCCCATCCC	
98	AAGTAGTTGGTTCCATCCC	
99	AAGTAGTCGGTCCCATCCC	
100	AAGTAGTTGGTCCCGTCCC	
101	ヒトライノウイルス37 5' UTR EU096024.1	
102	CACTAGTTTGGYCGATGAGGCT	20
103	CTAGTYTGGTCGATGAGGC	
104	CTAGTYTGGTCGATGAGG	
105	GTYTGGTCGATGAGGC	
106	TAGTYTGGTCGATGAGGCT	
107	TAGTUTGGTCGATGAGGCT	
108	RCATT CAGGGGCCGGAGG	
109	AGCCTGCGTGGCGGCCARCC	
110	CCUGCGTGGCTGCCTRC	
111	CTGCGTGGTGCCCTACC	30
112	CCYGCGTGGCTGCCTAC	
113	AGCCYGC GTGGCTG	
114	AGCCYGC GTGGCTGCC	
115	GRTTAGCCRCATT CRGGRGCCGGAGGA	
116	GCATT CAGGGGCCGGAGG	
117	GAAACACGGACACCCAAAGTAGTYGG	
118	GAAACACGGACACCCAAAGTAGTYGGTCC	
119	AAGTAGTCGGTCCCGTCCC	40

10

20

30

40

50

【表 16-5】

120	ヒトライノウイルスA2 EU095989.1 GI:158830711
121	YRGRCYTGGCAGATGRGGC
122	TARACCTGGCAGATGRGGC
123	TAGACCTGGCAGATGGGGC
124	TAGACCTGGCAGATGRGGC
125	TARACCTGGCAGATGGGGC
126	TARACCTGGTAGATGRGGC
127	TARACCTGGCAGATGRG
128	TARACCTGGCAGATGRGG
129	CARACCTGGCAGATGRGGC
130	CCTGCCAGATGRGGC
131	WGCCTGCGYGGCKGCCWRC
132	CCYGCGCGGCTGCCTRC
133	CCYGCGTGGCTGCCTRC
134	CCYGCGTGGCTGCCTGC
135	WGCCYGCCTGGCTGCCTGC
136	AGCCYGCCTGGCTGCCTGC
137	GRTTAGCCGCATTCRGGRGCCGAGGA
138	TACATGCACATCKCSGGVCAGGAYGCTCGGAGTACCTGAGCCCCG
139	ACGCCTCGGAGTACCTGAGCCC
140	CGGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGT
141	GTKGCRCGGGCRAAYTGACCA
142	GTKGCRCGGGCRAACTGC
143	GTGGCGCGGGCAAAGTGC
144	GTKGCRCGGGCRAACTGC
145	GTGGCRCGGGCRAACTGC
146	GTKGCRCGGGCRAACTGC
147	GTGGCRCGGGCRAACTGC
148	GTGGCRCGGGCRAACTGC
149	GTKGCRCGGGCRAACTGC
150	ヒトメタニューモウイルス分離株NL/1/99、完全ゲノム。AY525843.1 GI:50059145
151	CSSCCAATTTTGCTAGTGTGTTCTTGG

10

20

30

40

50

【表 16 - 6】

152	CGGCCAATTTTGCTAGTGTTGTTCTTGG
153	CAATTTTGCTAGTGTTGTTCTTGG
154	CCAATTTTGCTAGTGTTGTTCTTGG
155	TGCTTCAGGTYTAGGYATAATCGGAATGTWCAGAGG
156	TGCTTCAGGTTTAGGCATAATCGGAATGTTTCAGAGG
157	TGCTTCAGGTCTAGGTATAATCGGAATGT
158	GCAGAAAATAGCTCTGTGTTTGG
159	ヒトメタニューモウイルス分離株SIN05NTU84核タンパク質(N)遺伝子、部分cds JQ309642.1 GI:374721604
160	CTTTGCAAGTGTTGTTCTCGG
161	TGCCTCAGGCYTAGGCATAATMGGYATGTATCGHGGG
162	TCAGGCTTAGGCATAATAGGTATGTATCG
163	CCTCAGGCTTAGGCATAATAGGTATGTATCGAG
164	CCTCAGGCTTAGGCATAATAGGTATGTATCG
165	CCTCAGGCTTAGGCATAATAGGTATGTATCGCG
166	CCTCAGGCTTAGGCATAATAGGTATGTATCGUG
167	TGCCTCAGGCCTAGGCATAATCGGCATGTATCGUGGG
168	TGCCTCAGGCCTAGGCATAATCGGCATGTATCGTGGG
169	CTCAGGCTTAGGCATAATAGGTATGTATCGCG
170	TGCCTCAGGCTTAGGCATAATAGGTATGTATCGC
171	TGCCTCAGGCTTAGGCATAATAGGTATGTATCGCG
172	TGCCTCAGGCTTAGGCATAATAGGTATGTATCGCGG
173	TGCCTCAGGCTTAGGCATAATAGGTATGTATCGUGGG
174	TGCCTCAGGCTTAGGCATAATAGGTATGTATCGAGGG
175	TGCCTCAGGCTTAGGCATAATCGGTATGTATCGCGGG
176	TGCCTCAGGCTTAGGCATAATAGGTATGTATCGCGGG
177	CTGCTGCWGAATAAGYTCTGTGTTTGG
178	TGCTGAAAATAGTTCTGTGTTTGG

10

20

30

配列記号は、World Intellectual Property Organization (WIPO) の Handbook on Industrial Property Information and Documentation, Standard ST. 25 (1998) (「WIPO ST. 25 (1998)」) の表 1 に従う。

【0227】

40

論文、特許、および特許出願、ならびに本明細書において言及または引用された他の全ての文書および電子的に利用可能な情報の内容は、各個々の出版物が、参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されるのと同程度に、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。出願人は、任意のこのような論文、特許、特許出願、または他の物理的および電子的文書からのあらゆる資料および情報を、本出願に物理的に組み込む権利を留保する。

【0228】

本明細書に例示的に記載された方法は、本明細書に具体的に開示されていないいずれの要素（単数または複数）または制限（単数または複数）がなくても好適に実施され得る。請求される開示の範囲内で様々な修正が可能であることが認識される。したがって、本開

50

示は好ましい実施形態および任意選択の特徴によって具体的に開示されてきたものの、本明細書で開示された本開示において具体化された本開示の修正および変形が当業者によって用いられてもよく、またそのような修正および変形は本開示の範囲内であるとみなされることを理解されたい。

【0229】

本開示は、本明細書で広く一般的に説明されている。包括的開示に含まれるより狭い種および亜属集団の各々も、本方法の一部を形成する。これには、削除された材料が本明細書に具体的に列挙されているかどうかに関係なく、いずれの主題も属から排除する条件または否定的な制限を伴う方法の総括的説明が含まれる。

【0230】

他の実施形態は、以下の特許請求の範囲内にある。加えて、本方法の特徴または態様がマーカッシュグループに関して説明されている場合、当業者は、それにより、マーカッシュグループの個々のメンバーまたはメンバーのサブグループに関しても開示が説明されることを認識する。

【配列表】

0007370832000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 7/00 (2006.01)

F I

C 1 2 N 7/00

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 1, サンディエゴ, ストーニー リッジ アベニュー
1 0 5 6 0

(72)発明者 アンバー ヒリウス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 6, サンディエゴ, ヒラリー ドライブ 9 3 6 5,
アパートメント 2 1 2 0 2

(72)発明者 パメラ ダグラス

アメリカ合衆国 ミズーリ 6 4 1 5 7, カンザスシティ, エヌイー 9 8 ティーエイチ ストリ
ート 8 1 0 8

(72)発明者 ダニエル コルク

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 6 5, ラモナ, プレスティージ ロード 2 1 1 8

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 0 8 9 8 5 9 (U S, A 1)

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2004年, Vol.42, No.3, pp.981-986

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 1 1

C 1 2 Q 1 / 6 8 5 3

C 1 2 Q 1 / 6 8 6

C 1 2 Q 1 / 6 8 7 6

C 1 2 Q 1 / 7 0

C 1 2 N 7 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)