(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-547023
(P2022-547023A)
(43)公表日　令和4年11月10日(2022.11.10)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/50 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/50		４Ｂ０６３
Ｃ１２Ｑ	*1/70 (2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/70	ＺＮＡ	
Ｃ１２Ｑ	*1/6844(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6844	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ	*1/6816(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6816	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ	*1/686(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/686	Ｚ	

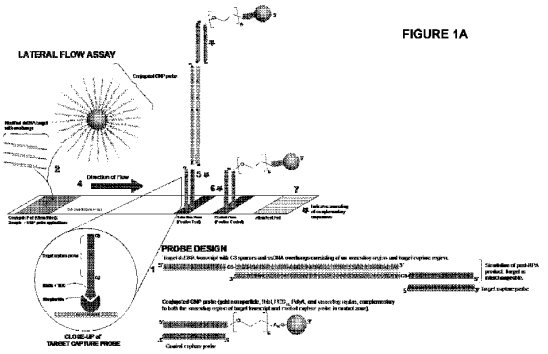
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全43頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-514151(P2022-514151)
(86)(22)出願日　令和2年9月3日(2020.9.3)
(85)翻訳文提出日　令和4年4月28日(2022.4.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/049290
(87)国際公開番号　WO2021/046278
(87)国際公開日　令和3年3月11日(2021.3.11)
(31)優先権主張番号　62/895,387
(32)優先日　令和1年9月3日(2019.9.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/934,754
(32)優先日　令和1年11月13日(2019.11.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/006,570
最終頁に続く

(71)出願人　508128082
ザ・リージエンツ・オブ・ザ・ユニバーシテイ・オブ・コロラド、ア・ボデイー・コーポレイト
アメリカ合衆国、コロラド・８０２０３、デンバー、グラント・ストリート・１８００、エイス・フロア
(71)出願人　522080188
ソーヤー，サラ，エル．
ＳＡＷＹＥＲ，Ｓａｒａ，Ｌ．
アメリカ合衆国 コロラド州 ８０３０２，ボルダー，１０番ストリート ９６６
９６６ １０ｔｈ Ｓｔｒｅｅｔ，Ｂｏｕｌｄｅｒ，ＣＯ ８０３０２（ＵＳ）
(74)代理人　110000659弁理士法人広江アソシエイ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　感染の宿主ＲＮＡバイオマーカーの迅速な早期検出及びヒトにおけるＣＯＶＩＤ－１９コロナウイルス感染の早期同定のためのシステム、方法、及び組成物。

(57)【要約】
本発明の技術は、病原性感染の宿主特性の検出のためのシステム、方法、及び組成物、特に感染のバイオマーカーでありうる標的ＲＮＡ転写物を検出するように構成された迅速な検出アッセイに関する。一実施形態において、本発明は、新規の側方流動アッセイを通じた無症候性対象における病原体又は感染の早期検出のためのシステム、方法、及び組成物を含みうるが、それは、好ましい実施形態において、病原体又は感染への応答において対象の自然免疫系により産生され、唾液中に存在する１つ又は複数のＲＮＡ転写物バイオマーカーを検出するように構成された迅速自己投与テストストリップを含みうる。
【選択図】図１Ａ



【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の工程を含む、宿主ＲＮＡ転写物バイオマーカーを検出する方法：
－　ＲＮＡ転写物バイオマーカーを含む対象から体液サンプルを収集すること；
－　前記ＲＮＡ転写物バイオマーカーを、ＤＮＡプローブ、例えば二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）、又は以下を有するハイブリッド二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）プローブなどに変換すること：
－　ｄｓＤＮＡ標的配列；
－　一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）アニーリング領域；及び
－　ｓｓＤＮＡ標的捕捉領域；
－　前記ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブをＤＮＡコンジュゲートレポータープローブに導入することであって、ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブ上の前記ｓｓＤＮＡアニーリング領域は、２つのプローブが溶液中で一緒に結合されるように、前記ＤＮＡコンジュゲートレポータープローブのｓｓＤＮＡアニーリング領域に相補的である；
－　ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブ及びＤＮＡコンジュゲートレポータープローブ溶液を側方流動アッセイテストストリップに導入すること；
－　前記溶液を前記側方流動アッセイテストストリップ上の少なくとも１つの検出ゾーンを通過させ、前記検出ゾーンは、前記ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブ上の前記ｓｓＤＮＡ標的捕捉領域に相補的であるｓｓＤＮＡ領域を有する複数の埋め込まれた標的捕捉プローブを含む；
－　前記ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブ上の前記相補的標的捕捉領域を、前記標的捕捉プローブ上の前記標的捕捉領域とアニーリングすることにより、前記ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブ、前記ＤＮＡコンジュゲートレポータープローブ、及び前記標的捕捉プローブを含む、固定化された複合体凝集体を形成すること；
－　検出可能なシグナルが産生されるように、複数の固定化された複合体凝集体が前記検出ゾーン中に形成されることを可能にすること。
【請求項２】
前記体液サンプルが唾液サンプルを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
変換する前記工程が、等温逆転写リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＴ－ＲＰＡ）反応を通じて前記ＲＮＡ転写物バイオマーカーをＤＮＡプローブに変換する工程を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
等温逆転写リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＴ－ＲＰＡ）反応を産生するために必要な試薬が、反応シリンダー中に事前に充填される、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記ｄｓＤＮＡ標的配列が、リンカーを通じて前記ｓｓＤＮＡアニーリング領域及び前記ｓｓＤＮＡ標的捕捉領域と結合される、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記リンカーが、三炭素鎖スペーサー（C_3）リンカーを含む、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記ＤＮＡコンジュゲートレポータープローブが、コンジュゲート金ナノ粒子（ＧＮＰ）プローブを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記コンジュゲート（ＧＮＰ）プローブが、チオール、PEG_{18}、及びＰｏｌｙＡ構築物を通じて前記ｓｓＤＮＡアニーリング領域に結合されたＧＮＰを含む、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記標的捕捉プローブが、前記ハイブリッドストレプトアビジン上の前記標的捕捉領域

に相補的である前記ｓｓＤＮＡ標的捕捉プローブ配列とさらに結合されうるビオチン－ＴＥＧリンカーと結合された固定化ストレプトアビジンベース四量体を有する標的捕捉プローブを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記側方流動アッセイテストストリップがさらに以下を含む、請求項１及び８のいずれか一項に記載の方法：
－　前記溶液が、毛細管作用を介して吸収パッドに向かって流れることを可能にする、膜との流体連結におけるコンジュゲートパッドであって、前記吸収パッドは、前記検出ゾーンの遠位に配置される；
－　非結合コンジュゲート金ナノ粒子（ＧＮＰ）プローブを固定化させうる制御ゾーン。
【請求項１１】
前記膜がニトロセルロース膜を含む、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記ＲＮＡ転写物バイオマーカーが、配列番号１～４４４、及び６５７～８１５からなる群より選択される少なくとも１つのヌクレオチド配列によりコードされる少なくとも１つのＲＮＡ転写物バイオマーカーを含む、
請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
以下を含む、ＲＮＡ転写物バイオマーカーの早期検出のための側方流動アッセイ：
－　対象からの、宿主ＲＮＡ転写物バイオマーカーを有する体液サンプル；
－　唾液サンプルを受けるように構成され、等温逆転写リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＴ－ＲＰＡ）反応を通じて増幅サンプルを生成するようにさらに構成された反応シリンダーであって、前記増幅サンプルは、ＤＮＡコンジュゲートレポータープローブと結合されたハイブリッドｄｓＤＮＡプローブを含む；
－　増幅サンプルを受けるように構成されたコンジュゲートパッド；
－　前記コンジュゲートパッドとの流体連結において、前記溶液が、毛細管作用を介して前記膜を通じて流れることを可能にするようにさらに構成された膜；
－　前記ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブを結合及び固定化するように構成された、複数の埋め込まれた標的捕捉プローブを含む検出ゾーン；
－　１つ又は複数の非結合ＤＮＡコンジュゲートレポータープローブを結合及び固定化するように構成された制御ゾーン；及び
－　前記検出ゾーン及び前記制御ゾーンの遠位に配置された吸収パッド。
【請求項１４】
前記体液サンプルが唾液サンプルを含む、請求項１３に記載の側方流動アッセイ。
【請求項１５】
前記等温ＲＴ－ＲＰＡ反応を産生するために必要な試薬が、前記反応シリンダー中に事前に充填されている、請求項１３に記載の側方流動アッセイ。
【請求項１６】
前記膜がニトロセルロース膜を含む、請求項１３に記載の側方流動アッセイ。
【請求項１７】
前記ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブが以下を含む、請求項１３に記載の側方流動アッセイ：
－　ｄｓＤＮＡ標的配列；
－　ｓｓＤＮＡアニーリング領域；及び
－　ｓｓＤＮＡ標的捕捉領域。
【請求項１８】
ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブ上の前記ｓｓＤＮＡアニーリング領域が、前記２つのプローブが前記増幅溶液中で一緒に結合されるように、前記ＤＮＡコンジュゲートレポータープローブのｓｓＤＮＡアニーリング領域に相補的である、請求項１７に記載の側方流動アッセイ。

【請求項１９】
前記ｄｓＤＮＡ標的配列が、リンカーを通じて前記ｓｓＤＮＡアニーリング領域及び前記ｓｓＤＮＡ標的捕捉領域と結合される、請求項１８に記載の側方流動アッセイ。
【請求項２０】
前記リンカーが三炭素鎖スペーサー（C_3）リンカーを含む、請求項１９に記載の側方流動アッセイ。
【請求項２１】
前記ＤＮＡコンジュゲートレポータープローブが、コンジュゲート金ナノ粒子（ＧＮＰ）プローブを含む、請求項１３に記載の側方流動アッセイ。
【請求項２２】
前記コンジュゲートＧＮＰプローブが、チオール、PEG_{18}、及びＰｏｌｙＡ構築物を通じて前記ｓｓＤＮＡアニーリング領域に結合されたＧＮＰを含む、請求項２１に記載の側方流動アッセイ。
【請求項２３】
前記標的捕捉プローブが、前記ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブ上の前記標的捕捉領域に相補的である前記ｓｓＤＮＡ標的捕捉プローブ配列とさらに結合されうるビオチン－ＴＥＧリンカーと結合された固定化ストレプトアビジンベース四量体を有する標的捕捉プローブを含む、請求項１３及び１７のいずれかに記載の側方流動アッセイ。
【請求項２４】
前記宿主ＲＮＡ転写物バイオマーカーが、配列番号１～４４４、及び６５７～８１５からなる群より選択される少なくとも１つのヌクレオチド配列によりコードされる少なくとも１つのＲＮＡ転写物バイオマーカーを含む、請求項１３に記載の側方流動アッセイ。
【請求項２５】
以下を含む、ＲＮＡ転写物バイオマーカーの早期検出のための抗体ベースの側方流動アッセイ：
－　対象からの、宿主ＲＮＡ転写物バイオマーカーを有する体液サンプル；
－　唾液サンプルを受けるように構成され、等温逆転写リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＴ－ＲＰＡ）反応を通じて増幅サンプルを生成するようにさらに構成された反応シリンダーであって、前記増幅サンプルは、抗体コンジュゲートレポータープローブと結合されたハイブリッドｄｓＤＮＡプローブを含む；
－　増幅サンプルを受けるように構成されたコンジュゲートパッド；
－　前記コンジュゲートパッドとの流体連結において、前記増幅サンプルが、毛細管作用を介して前記膜を通じて流れることを可能にするようにさらに構成された膜；
－　前記ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブを結合及び固定化するように構成された、複数の埋め込まれた抗体標的捕捉プローブを含む検出ゾーン；
－　前記ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブを結合及び固定化するように構成された、複数の埋め込まれた抗体標的捕捉プローブを含む制御ゾーン；
－　１つ又は複数の抗体ＤＮＡコンジュゲートレポータープローブに結合及び固定化するように構成された抗体を有する捕捉ゾーン。
【請求項２６】
前記体液サンプルが唾液サンプルを含む、請求項２５に記載の抗体ベースの側方流動アッセイ。
【請求項２７】
前記等温ＲＴ－ＲＰＡ反応を産生するために必要な試薬が、前記反応シリンダー中に事前に充填されている、請求項２５に記載の抗体ベースの側方流動アッセイ。
【請求項２８】
前記膜がニトロセルロース膜を含む、請求項２５に記載の抗体ベースの側方流動アッセイ。
【請求項２９】
前記ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブが以下を含む、請求項２５に記載の抗体ベースの

側方流動アッセイ：
－　ｄｓＤＮＡ標的配列；
－　５’フォワードｓｓＤＮＡオリゴ；及び
－　５’リバースｓｓＤＮＡオリゴ。
【請求項３０】
前記５’フォワードｓｓＤＮＡオリゴが５’ＦＩＴＣフォワードオリゴを含む、請求項２９に記載の抗体ベースの側方流動アッセイ。
【請求項３１】
前記５’リバースｓｓＤＮＡオリゴが５’ＤＩＧリバースオリゴ、又は５’ビオチンリバースオリゴを含む、請求項２５に記載の抗体ベースの側方流動アッセイ。
【請求項３２】
前記コンジュゲートレポータープローブが、抗体コンジュゲートレポータープローブを形成する抗体と結合された金ナノ粒子（ＧＮＰ）を含む、請求項３０に記載の抗体ベースの側方流動アッセイ。
【請求項３３】
前記抗体が抗ＦＩＴＣ抗体を含む、請求項３２に記載の抗体ベースの側方流動アッセイ。
【請求項３４】
前記ＦＩＴＣ抗体が、前記ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブの前記５’ＦＩＴＣフォワードオリゴに結合する、請求項３０及び３３に記載の抗体ベースの側方流動アッセイ。
【請求項３５】
前記検出ゾーンの前記標的捕捉プローブが抗ＤＩＧ抗体を含む、請求項２５に記載の抗体ベースの側方流動アッセイ。
【請求項３６】
前記抗ＤＩＧ抗体が、前記ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブの５’ＤＩＧリバースオリゴに結合する、請求項３１及び３５に記載の抗体ベースの側方流動アッセイ。
【請求項３７】
前記制御ゾーンの前記標的捕捉プローブが、前記５’ビオチンリバースオリゴとさらに結合されうるビオチン―ＴＥＧリンカーと結合された固定化ストレプトアビジンベース四量体を有する標的捕捉プローブを含む、請求項２５及び３１に記載の抗体ベースの側方流動アッセイ。
【請求項３８】
前記検出ゾーンの前記標的捕捉プローブが抗ウサギ抗体を含む、請求項３０に記載の抗体ベースの側方流動アッセイ。
【請求項３９】
前記宿主ＲＮＡ転写物バイオマーカーが、配列番号１～４４４、及び６５７～８１５からなる群より選択される少なくとも１つのヌクレオチド配列によりコードされる少なくとも１つのＲＮＡ転写物バイオマーカーを含む、請求項２５に記載の抗体ベースの側方流動アッセイ。
【請求項４０】
以下の工程を含む、早期病原体検出の方法：
－　第１の対象から体液サンプルを収集すること；
－　宿主由来の感染のバイオマーカー及び病原体バイオマーカーを前記体液サンプルから抽出すること；
－　ＰＣＲ、リアルタイムＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）、又は定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（ｑＲＴ－ＰＣＲ）を通じて、前記の宿主由来の感染のバイオマーカー及び病原体バイオマーカーを定量化すること；
－　宿主由来の感染のバイオマーカーのレベルの時間経過を確立し、場合により、前記の宿主由来の感染のバイオマーカーを、前記体液サンプル中の病原体バイオマーカーの前記レベルと相関させること；

－　場合により、上の４つの工程を異なる時間点で反復すること；
－　宿主由来の感染のバイオマーカーを含む第２の対象から体液サンプルを収集すること；
－　前記病原体での感染と相関する１つ又は複数の宿主由来の感染のバイオマーカーを検出すること。
【請求項４１】
前記体液サンプルが唾液サンプルを含む、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
前記の宿主由来の感染のバイオマーカーが、宿主由来の感染のＲＮＡバイオマーカーを含む、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記病原体バイオマーカーが、ウイルス病原体バイオマーカー、細菌病原体バイオマーカー、及び病原体真菌バイオマーカーからなる群より選択される病原体バイオマーカーを含む、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記ウイルス病原体バイオマーカーが、新型コロナウイルスＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２からのウイルス病原体バイオマーカーを含む、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
新型コロナウイルスＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２からの前記ウイルス病原体バイオマーカーが、配列番号４６９～４８０に従ったヌクレオチドプライマーによるＰＣＲ反応において増幅されうる１つ又は複数のバイオマーカーを含む、請求項４０に記載の方法。
【請求項４６】
前記の宿主由来の感染のバイオマーカーが、宿主由来の感染のＲＮＡバイオマーカーを含み、前記宿主由来の感染のＲＮＡバイオマーカーを、等温逆転写リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＴ－ＲＰＡ）反応を通じてハイブリッド二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）プローブ中に変換する工程をさらに含む、請求項４０に記載の方法。
【請求項４７】
前記の検出する工程が、請求項１～１２に記載の方法を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４８】
感染の少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを、前記対象により提供される生物学的サンプルからを検出する工程を含み、感染の前記の少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーが、配列番号１～４４４、及び６５７～８１５に従ったヌクレオチド配列によりコードされる感染の宿主由来ＲＮＡバイオマーカーからなる群より選択される、それを必要とする対象において感染を検出する方法。
【請求項４９】
前記の検出する工程が、請求項１～１２に記載の方法を含む、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記の検出する工程が、前記の宿主由来の感染のＲＮＡバイオマーカーを検出する工程を含み、宿主由来の感染のＲＮＡバイオマーカーを、ＰＣＲ、ＲＴ－ＰＣＲ、又はｑＲＴ－ＰＣＲを使用して検出することを含む、請求項４８に記載の方法。
【請求項５１】
少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを、対象により提供される生物学的サンプルから検出するように構成された側方流動アッセイであって、前記の少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーが、配列番号１～４４４、及び６５７～８１５に従ったヌクレオチド配列によりコードされる宿主由来ＲＮＡバイオマーカーからなる群より選択される側方流動アッセイ。
【請求項５２】
少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを、対象により提供される生物学的サンプルから検出するように構成されたアッセイであって、前記の少なくとも１つの宿主由

来ＲＮＡバイオマーカーが、配列番号１～４４４、及び６５７～８１５に従ったヌクレオチド配列によりコードされる宿主由来ＲＮＡバイオマーカーからなる群より選択され、前記アッセイが、ＰＣＲアッセイ、ＲＴ－ＰＣＲアッセイ、又はｑＲＴ－ＰＣＲアッセイであるアッセイ。

【請求項５３】

少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを、対象により提供される生物学的サンプルから検出するように構成されたマイクロアレイアッセイであって、前記の少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーが、配列番号１～４４４、及び６５７～８１５に従ったヌクレオチド配列によりコードされる宿主由来ＲＮＡバイオマーカーからなる群より選択されるマイクロアレイアッセイ。

【請求項５４】

ウイルス感染について示す少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを、対象により提供される生物学的サンプルから検出するように構成された側方流動アッセイであって、ウイルス感染について示す前記の少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーが、ＩＦＩＴ２、ＩＣＡＭ１、ＥＲＧ１、ＩＦＩＨ１、ＩＳＧ１５、ＣＦＢ、ＣＸＣＬ１０、ＤＤＸ５８、及びＩＲＡＫ２からなる群より選択される側方流動アッセイ。

【請求項５５】

ウイルス感染について示す少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを、対象により提供される生物学的サンプルから検出するように構成されたアッセイであって、ウイルス感染について示す前記の少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーが、ＩＦＩＴ２、ＩＣＡＭ１、ＥＲＧ１、ＩＦＩＨ１、ＩＳＧ１５、ＣＦＢ、ＣＸＣＬ１０、ＤＤＸ５８、及びＩＲＡＫ２からなる群より選択され、前記アッセイが、ＰＣＲアッセイ、ＲＴ－ＰＣＲアッセイ、又はｑＲＴ－ＰＣＲアッセイであるアッセイ。

【請求項５６】

ウイルス感染について示す少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを、対象により提供される生物学的サンプルから検出するように構成されたマイクロアレイアッセイであって、ウイルス感染について示す前記の少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーが、ＩＦＩＴ２、ＩＣＡＭ１、ＥＲＧ１、ＩＦＩＨ１、ＩＳＧ１５、ＣＦＢ、ＣＸＣＬ１０、ＤＤＸ５８、及びＩＲＡＫ２からなる群より選択されるマイクロアレイアッセイ。

【請求項５７】

対象により提供される生物学的サンプルにおいて示される少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを検出することを含む、それを必要とする対象においてウイルス感染を検出する方法であって、ウイルス感染について示す前記の少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーが、ＩＦＩＴ２、ＩＣＡＭ１、ＥＲＧ１、ＩＦＩＨ１、ＩＳＧ１５、ＣＦＢ、ＣＸＣＬ１０、ＤＤＸ５８、及びＩＲＡＫ２からなる群より選択され、生物学的サンプルが唾液である方法。

【請求項５８】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染について示す少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを、対象により提供される生物学的サンプルから検出するように構成された側方流動アッセイであって、ウイルス感染について示す前記の少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーが、ＭＸ１、ＰＡＲＰ１２、ＩＦＩＴＭ２、ＣＤ６８、及びＳＥＲＩＮＢ３からなる群より選択される側方流動アッセイ。

【請求項５９】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染について示す少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを、対象により提供される生物学的サンプルから検出するように構成されたアッセイであって、ウイルス感染について示す前記の少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーが、ＭＸ１、ＰＡＲＰ１２、ＩＦＩＴＭ２、ＣＤ６８、及びＳＥＲＩＮＢ３からなる群より選択され、前記アッセイが、ＰＣＲアッセイ、ＲＴ－ＰＣＲアッセイ、又はｑＲＴ－ＰＣＲアッセイであるアッセイ。

【請求項６０】
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染について示す少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを、対象により提供される生物学的サンプルから検出するように構成されたマイクロアレイアッセイであって、ウイルス感染について示す前記の少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーが、ＭＸ１、ＰＡＲＰ１２、ＩＦＩＴＭ２、ＣＤ６８、及びＳＥＲＩＮＢ３からなる群より選択されるマイクロアレイアッセイ。
【請求項６１】
対象により提供される生物学的サンプルにおいて少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを検出することを含む、それを必要とする対象においてＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染を検出する方法であって、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染について示す前記の少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーが、ＭＸ１、ＰＡＲＰ１２、ＩＦＩＴＭ２、ＣＤ６８、及びＳＥＲＩＮＢ３からなる群より選択され、前記生物学的サンプルが唾液である方法。
【請求項６２】
インフルエンザ感染について示す少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを、対象により提供される生物学的サンプルから検出するように構成された側方流動アッセイであって、ウイルス感染について示す前記の少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーが、ＰＬＲＧ１、ＭＳＣ、ＮＫＧ７、ＮＭＥ８、及びＭＭＰ１２からなる群より選択される側方流動アッセイ。
【請求項６３】
インフルエンザ感染について示す少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを、対象により提供される生物学的サンプルから検出するように構成されたアッセイであって、ウイルス感染について示す前記の少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーが、ＰＬＲＧ１、ＭＳＣ、ＮＫＧ７、ＮＭＥ８、及びＭＭＰ１２からなる群より選択され、前記アッセイが、ＰＣＲアッセイ、ＲＴ－ＰＣＲアッセイ、又はｑＲＴ－ＰＣＲアッセイであるアッセイ。
【請求項６４】
インフルエンザ感染について示す少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを、対象により提供される生物学的サンプルから検出するように構成されたマイクロアレイアッセイであって、ウイルス感染について示す前記の少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーが、ＰＬＲＧ１、ＭＳＣ、ＮＫＧ７、ＮＭＥ８、及びＭＭＰ１２からなる群より選択されるマイクロアレイアッセイ。
【請求項６５】
対象により提供される生物学的サンプルにおいて少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを検出することを含む、それを必要とする対象においてインフルエンザ感染を検出する方法であって、インフルエンザ感染について示す前記の少なくとも１つの宿主由来ＲＮＡバイオマーカーが、ＰＬＲＧ１、ＭＳＣ、ＮＫＧ７、ＮＭＥ８、及びＭＭＰ１２からなる群より選択され、前記生物学的サンプルが唾液である方法。
【請求項６６】
前記ＲＮＡバイオマーカーが、配列番号１～４４４、及び６５７～８１５に従ったヌクレオチド配列によりコードされる宿主由来ＲＮＡバイオマーカーからなる群より選択される、請求項５１～６４のいずれかに記載の方法。
【請求項６７】
それを必要とする対象における感染を検出するために使用される宿主由来ＲＮＡバイオマーカーをコードするヌクレオチド配列であって、前記ＲＮＡバイオマーカーが、配列番号１～４４４、及び６５７～８１５に従ったヌクレオチド配列からなる群より選択される、ヌクレオチド配列。
【請求項６８】
以下を含む、宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを検出する方法：
－　宿主由来ＲＮＡバイオマーカー及び、場合により、ウイルス感染、細菌感染、又は

真菌感染のバイオマーカーを潜在的に含む体液サンプルを収集すること；
－ サンプル中の前記宿主由来ＲＮＡバイオマーカーの転写物及び、場合により、ウイルス感染、細菌感染、又は真菌感染のバイオマーカーを、ＰＣＲ、ＲＴ－ＰＣＲ、ｑＰＣＲ、転写物配列決定、側方流動アッセイ、ハイブリダイゼーションアッセイ、マイクロアレイ、核酸検出アッセイからなる群より選択される方法を使用して同定すること。
【請求項６９】
前記体液サンプルが唾液サンプルを含む、請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
前記の宿主由来の感染のバイオマーカーが、宿主由来の感染のＲＮＡバイオマーカーを含む、請求項６９に記載の方法。
【請求項７１】
前記の宿主由来の感染のＲＮＡバイオマーカーが、ウイルス病原体バイオマーカー、細菌病原体バイオマーカー、及び病原体真菌バイオマーカーからなる群より選択される病原体バイオマーカーを含む、請求項７０に記載の方法。
【請求項７２】
前記ウイルス病原体バイオマーカーが、新型コロナウイルスＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２からのウイルス病原体バイオマーカーを含む、請求項７１に記載の方法。
【請求項７３】
新型コロナウイルスＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２からの前記ウイルス病原体バイオマーカーが、配列番号４６９～４８０に従ったヌクレオチドプライマーによるＰＣＲ反応において増幅されうる１つ又は複数のバイオマーカーを含む、請求項７２に記載の方法。
【請求項７４】
前記の宿主由来の感染のバイオマーカーが、宿主由来の感染のＲＮＡバイオマーカーを含み、前記宿主由来の感染のＲＮＡバイオマーカーを、等温逆転写リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＴ－ＲＰＡ）反応を通じてハイブリッド二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）プローブ中に変換する工程をさらに含む、請求項７０に記載の方法。
【請求項７５】
前記宿主由来の感染のバイオマーカーが、宿主由来の感染のＲＮＡバイオマーカーを含み、配列番号１～４４４、及び６５７～８１５に従ったヌクレオチド配列によりコードされる宿主由来の感染のＲＮＡバイオマーカーからなる群より選択される、請求項７０に記載の方法。
【請求項７６】
ウイルス感染、細菌感染、又は真菌感染の前記バイオマーカーが、ウイルス感染、細菌感染、又は真菌感染のＲＮＡバイオマーカーを含む、請求項７０に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本願は、２０１９年９月３日に出願された米国仮出願第６２／８９５，３８７号、２０１９年１１月１３日に出願された米国仮出願第６２／９３４，７５４号、及び２０２０年４月７日に出願された米国仮出願第６３／００６，５７０号の利益及び優先権を主張する。上で参照した出願の全体の明細書及び図は、参照によりその全体において本明細書により組み込まれる。
【０００２】
連邦政府により資金提供された研究の声明
本発明は、国防脅威削減局（ＤＴＲＡ）によって授与された助成金番号ＨＤＴＲＡ１－１８－１－００３２の下で政府の支援によりなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。
【０００３】
配列リスト
本願は、ＡＳＣＩＩフォーマットで電子的に提出され、参照によりその全体において本

明細書により組み込まれる配列表を含む。前記ＡＳＣＩＩコピーは、２０２０年８月３０日に作成されたが、「９０２４５．００４３２－Ｓｅｑｕｅｎｃｅ－Ｌｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔ」と名付けられており、サイズは２４７６キロバイトである。

【０００４】

本発明の技術は、病原性感染の宿主特性の検出のためのシステム、方法、及び組成物、特に感染のバイオマーカーでありうる標的ＲＮＡ転写物を検出するように構成された迅速な検出アッセイに関する。

【背景技術】

【０００５】

病原性微生物による感染の早期検出は、適当な処置及びポジティブな臨床転帰のために重要である。しかし、感染した個人は、病原体を他人に積極的に伝染させながら、感染後数日間にわたり無症候性のままでありうる。従来の病原体検出システムは、しばしば、症状の発症後まで感染を検出するのに効果的でない。従来の病原体テストは、血清学又は抗体ベースのテスト、細菌／ウイルス／真菌の増殖培養、及び核酸ベースの検出、例えばＰＣＲ（ポリメラーゼ連鎖反応）などを含む。そのような従来のテストは、しばしば、時間及び労力を集約的であり、患者が感染の症状を示し始めた後にだけ効果的である。加えて、従来の診断テストでは、特定の病原体、高価な検査室装置、訓練を受けた人員についての臨床的な疑いが要求され、上流及びエンドユーザーの費用を増加させてきた。

【０００６】

例えば、図２中で強調するように、典型的な感染経過において、未知の病原体への曝露は０日目に生じ、図の左側に沿って垂直に走るタイムラインにより示されるように、感染の後の臨床段階を通じて進行する。病原体は感染者内で複製するため、標準的な診断テストは、典型的には、症状の発症後、人々が何か間違ったことがあることを知って、医療及び診断を求める場合に機能するように設計されている。しかし、その時点で、その人は数日又は数週間にわたり他者に感染させていたであろう。早期検疫を実施し、妨害されない病原体伝染の破壊的な下流効果を制限する機会は過ぎている。この診断までの時間遅延は、患者が伝染性であることを知る前に、より不良な患者の転帰及び進行性の疾患伝染を招きうる。

【０００７】

特殊化され、後に発生する適応免疫応答とは対照的に、病原性微生物に対する宿主の最初の防御線は「自然免疫」応答である。身体の自然免疫は、感染の数時間以内に生じる自己増幅的で非特異的な生理学的応答である。そのようなものとして、宿主の自然免疫応答により産生された分子の存在を検出する能力によって、患者が依然として無症候性である間に、最初期段階で感染を迅速に検出する能力が提供されうる。そのような進歩によって、より効果的な検疫プロトコール、ならびに改善された処置及び臨床転帰が可能になりうる。

【０００８】

病原体を、特に感染サイクルの初期に検出する改善された方法についての必要性が、世界的なコロナウイルスのパンデミックにより拡大されている。具体的には、２０１９年に、ＣＯＶＩＤ－１９として同定された新型コロナウイルスが、高い感染率及び死亡率を有し、中国の武漢地域において出現し、後に世界中に広がり、重大な公衆衛生危機を招いた。コロナウイルスは、コロナウイルス科及びコロナウイルス亜科のメンバーであり、哺乳類及び鳥類において見出される。顕著なメンバーは、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）であり、それによって、２００２年から２００３年の間での中国における大流行の間に、罹患した個人のほぼ１０％が殺された。中東呼吸器症候群コロナウイルス（ＭＥＲＳコロナウイルス又はＭＥＲＳ－ＣｏＶ）と呼ばれる別の顕著なコロナウイルスＭＥＲＳ－ＣｏＶは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ大流行と一部の類似性を共有する。ＳＡＲＳの典型的な症状。ＭＥＲＳ及びＣＯＶＩＤ－１９コロナウイルス感染は、発熱、咳、息切れ、肺炎、及び胃腸症状を含む。重度の病気は、集中治療室における人工呼吸及び補助を要求する呼吸不全に導きうる。両方のコロナウイルスが、高齢者、弱まった免疫系を

伴う人々、慢性疾患、例えば癌、慢性肺疾患、及び糖尿病などを伴う人々において、より重度の疾患を起こすように見える。現在、ワクチン又は特定の処置は、ＣＯＶＩＤ－１９については利用可能ではない。ＣＯＶＩＤ－１９コロナウイルス感染と診断された患者は、個人の症状及び臨床状態に基づいた補助的処置を受けるだけである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

以下に概説するように、本発明者らは、宿主の早期自然免疫応答（インターフェロン応答を含むが、排他的ではない）を活用し、感染、ＣＯＶＩＤ－１９コロナウイルスでの特定の感染を示すＲＮＡバイオマーカーを迅速に検出しながら、従来の病原体検出システムの制限を克服している。この迅速なポイントオブケア診断適用によって、患者が典型的には無症候性である早期段階での感染の検出を可能にする。そのような早期発見は、より標的化された効果的な治療的介入ならびに全体的な改善された臨床転帰と直接的に相関している。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本発明の技術は、新規の側方流動アッセイを通じた無症候性対象における病原体及び／又は感染の早期検出のためのシステム、方法、及び組成物を含みうるが、それは、好ましい実施形態において、病原体又は感染への応答において対象の自然免疫系により産生され、唾液中に存在する１つ又は複数のＲＮＡ転写物バイオマーカーを検出するように構成された迅速テストストリップを含みうる。

【００１１】

別の態様において、本発明の技術は、新規の側方流動アッセイを通じた無症候性対象における病原体及び／又は感染の早期検出のためのシステム、方法、及び組成物を含みうるが、それは、好ましい実施形態において、病原体又は感染への応答において対象の自然免疫系により産生され、唾液中に存在しうる、配列番号１～４４４、及び６５７～８１５に従ったヌクレオチド配列の１つ又は複数によりコードされる１つ又は複数のＲＮＡ転写物バイオマーカーを検出するように構成された迅速テストストリップを含みうる。

【００１２】

本発明の追加の態様は、配列番号１～４４４、及び６５７～８１５において同定されたヌクレオチド配列に従った、ヒトにおける感染、好ましくは病原体感染についての１つ又は複数のバイオマーカーの使用を含む。

【００１３】

別の態様において、本発明の技術は、これらの標的ＲＮＡ転写物の検出のためのシステム、方法、及び組成物を含みうるが、それは、対象における早期感染についてのバイオマーカーとして作用しうる。

【００１４】

別の態様において、本発明の技術は、対象における早期感染の検出のためのシステム、方法、及び組成物を含みうるが、それは少なくとも以下を含みうる：毛細管作用を介して液体の流れを可能にするように構成された繊維状又は紙ベースの側方流動ストリップ、好ましくは含みうる側方流動アッセイテストストリップデバイス；２）事前に調製された反応シリンダー（対象から液体サンプルを受けるように構成され、ＲＴ－ＲＰＡ反応を実施するように事前に調製された回収容器を含みうる）中で生じうるＲＴ－ＲＰＡ（逆転写リコンビナーゼポリメラーゼ増幅）反応；及び３）１つ又は複数のＲＮＡバイオマーカー転写物、例えば、流体サンプル（好ましい実施形態において、対象により提供される唾液サンプルを含みうる）中で供給される、バイオマーカーとしても一般的に言及される、配列番号１～４４４、及び６５７～８１５として同定されるヌクレオチド配列によりコードされる１つ又は複数のバイオマーカー。好ましい実施形態において、ＲＮＡバイオマーカー転写物は、等温増幅ＲＴ－ＲＰＡ反応において反応シリンダー中で増幅されて、一本鎖アダプター配列を有するハイブリッドｄｓＤＮＡプローブ又は下流ハイブリダイゼーション

用の５’修飾を含むｄｓＤＮＡ産物のいずれかを形成しうる。
【００１５】
追加の態様は、ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブと結合しうる新規のコンジュゲートレポータープローブ（７）を含みうる。特定の態様において、新規のコンジュゲートプローブは、ＧＮＰ、又はｄｓＤＮＡプローブに結合しうるｓｓＤＮＡ配列又は抗体もしくは抗体フラグメントとコンジュゲートされた他の単一レポーターを含みうる。依然として、本発明のさらなる態様は、コンジュゲートレポータープローブ（７）、好ましくはＧＮＰレポータープローブにさらに結合されるハイブリッドｄｓＤＮＡプローブと結合された埋め込み捕捉プローブを含む、固定化された「サンドイッチ」複合凝集体に結合し、それを形成しうる新規の標的捕捉プローブを含みうる。この態様において、局在化された固定化は、例えば、テストストリップ、又は溶液でさえ、視覚シグナルの生成を促進しうる。
【００１６】
本発明の追加の態様は、病原体特異的バイオマーカーに関する、好ましくはＰＣＲ、ＲＴ－ＰＣＲ、又はｑＲＴ－ＰＣＲにより生成された定量化データと組み合わされうる、又はされない、感染の初期宿主由来バイオマーカーの定量化のためのシステム、方法、及び組成物を含む。１つの好ましい態様において、ＲＮＡは、潜在的に曝露又は感染された対象により提供される生物学的サンプルから抽出されうる。ＲＮＡはｑＲＴ－ＰＣＴ反応を経て、病原体バイオマーカー、ならびに感染の宿主由来バイオマーカー、好ましくは対象の唾液中に存在する宿主由来ＲＮＡバイオマーカーのレベルを決定してもよい。複数の生物学的サンプルを１人又は複数の対象から採取し、病原体の相対レベル、及び経時的な宿主由来バイオマーカーを示す感染の時間経過を生成してもよい。このデータを使用し、病原体特異的な宿主由来バイオマーカーを検出するための側方流動アッセイ用のバイオマーカー候補を生成してもよい。この側方流動アッセイを、それを必要とする対象に施し、感染の指標、ならびに１つ又は複数の特定の病原体による感染の段階を提供してもよい。１つの好ましい態様において、特定の病原体は、一般にＣＯＶＩＤ－１９コロナウイルスとして言及されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を含みうる。
【００１７】
本発明の追加の態様は、特許請求の範囲において示す、好ましい実施形態の１つ又は複数を含みうる。
【００１８】
本発明の追加の態様は、以下に提供する明細書、特許請求の範囲、及び図面から証明されうる。
【図面の簡単な説明】
【００１９】
本開示の新規の態様、特徴、及び利点は、添付の図面との併用において取られた以下の詳細な記載からより良好に理解されるであろうが、それらの全てを図示のためだけに与えており、現在開示する実施形態を限定しておらず、それにおいて：
【００２０】
【図１Ａ】図１（Ａ）は、その本発明の一実施形態における側方流動アッセイの一般的な概略図を示す。
【図１Ｂ】（Ｂ）その本発明の一実施形態における側方流動アッセイテストストリップの別の一般的な概要を示す。
【図２】図２は、感染経過の代表的な例を示す。
【図３Ａ】図３（Ａ）は、病原体感染を検出のための現在の最先端技術を実証する、例示的なインビボマウス実験を示す。この場合において、マウスの群が病原体に感染されうるが、血液サンプルを、感染後の示した日に収集する。これらのサンプルを、バイオマーカーの存在を特徴付けるために、ハイスループットシーケンシングを行うために使用し、また、本発明を、現在の最先端技術の検出方法と比較するためのテストを行うために使用してもよい。以下に示すのは、他の方法の数日前に病原体感染を検出する本発明の能力を示す例示的なデータである。図示するアッセイの全てを、以前のインビボ実験の間に行う。

【図３Ｂ】（Ｂ）仮説上のウイルス感染の予定表及びその感染を検出するために設計された種々のテストを示す。
【図４】図４は、その一実施形態における例示的な病原体検出デバイスを示し、特に、多重化のためのデバイスの能力を強調している。本発明の技術、特に側方流動アッセイテストストリップ又はテストストリップは、エンドユーザーの目的に依存し、複数の構成に適応可能である。（Ａ）初期スクリーニングテストとして、最も重要なパラメーターは、感染した個人が、彼らが実際に「病気」である場合に、「病気ではない」と不注意でラベル付けされないことを確実にする感度である。高感度テストは、真陽性の病気の症例の１００％近くを同定し、０％に近い偽陰性率を有する。ＲＮＡ転写物バイオマーカーアッセイの感度は、異なるバイオマーカーについての複数のテストラインの追加により調整可能であり、組み合わせにおいて検出される場合、全ての真陽性を同定する可能性が増加する。（Ｂ）多様な医療環境（例、救急部門、プライマリケアオフィス、補助医療施設、野戦病院など）の間で既に症候性の患者を評価する臨床医にとって、病原体の一般的なカテゴリー（即ち、ウイルスｖｓ．細菌ｖｓ．真菌）を区別し、原因物質の完全な同定の前に、最良の早期処置を開始することが重要である。本発明のアッセイは、処置計画を知らせ、非細菌感染の場合における抗生物質の使用を劇的に低下させ、抗生物質耐性細菌の伝播を制限するのを助けることができるであろう。（Ｃ）特定の生物への応答における宿主シグナルの早期研究によって、特定の病原性生物による感染が同定されうるアッセイ構成が可能になりうる。テストされた微生物のパネルは、エンドユーザーのニーズにより特定することができうる。例えば、軍隊は多様な空中浮遊病原体及び兵器化可能な病原体に最も関心があるであろうが、国内の診療所は季節性インフルエンザ、ＲＳＶ、ライノウイルス、及びノロウイルスについて患者を評価する必要がある。
【図５】図５は、その一実施形態における例示的な病原体検出デバイスの使用を示す。この実施形態において、患者は唾液サンプルを反応シリンダー中に提供し、それは、ここでは、増幅反応を室温で進行させ、バイオマーカー濃度を増加させることが可能でありうる、反応試薬が事前に充填されたチューブ容器として表されうる。これに続いて、増幅されたバイオマーカーを含む溶液を、側方流動ストリップに適用してもよい。流体がストリップを流れ落ちる際、目に見えるピンク色のシグナルが出現する。ストリップの最も単純な反復において、１つのバンドは陰性結果を意味し、２つのバンドは感染を示す陽性結果に等しい。消費者製品の実施形態において、ストリップは、結果の解釈の容易さのために、ハウジング中に含まれる。
【図６】図６（Ａ）は、健康なヒトのサンプルの配列データに従った、唾液及びＰＢＭＣ（末梢血単核細胞）中で発現されたＲＮＡ転写物の同一性における有意な重複を示すベン図を示す。この重複は、血液中に存在する転写物が唾液中にも出現する可能性が高いことを意味する。この転写物シークエンシングデータは、平均１，０００万回のリードカバレッジに対して標準化されており、これらの転写物の存在量を記載していないことに注意すること。（Ｂ）唾液及びＰＢＭＣ（同じ個人からの２つのサンプル）の両方において存在するＲＮＡ転写物の相対的な発現レベルを示す代表的なＰＣＣ（パターン相関係数）プロット。このグラフ中のすべてのドットが、Ａにおけるベン図の重複セクション中での異なる転写物を象徴する。平均ｒ値＝０．６４（＞０．５は有意な相関と考えられる）。全体的には、ＰＢＭＣ　ｖｓ．唾液における大半の転写物のより高いレベルの発現があるが、しかし、また、ＰＢＭＣと比べて唾液中で上方調節されている転写物のサブセットがある。このデータに起因して、本発明者らは、初期感染の重要なシグナルを同定するために選択される本発明者らのサンプル型として唾液を追跡することができる。
【図７】図７は、その一実施形態において感染のバイオマーカーを同定するための一般的なアプローチを示す。
【図８】図８は、インビトロトランスクリプトームデータセットを使用して同定された、感染についての宿主ＲＮＡバイオマーカーＩＦＩＴ２の例を示す。水平方向では、遺伝子構造が濃い青色バーで示され、遺伝子のコード領域を示している。垂直方向では、ピークの高さは、示されたＲＮＡの相対的な存在量を表す。各々の試験について、「－」レーン

は非感染サンプルを示し、「＋」レーンは種々の型のウイルス感染を示す。異なる試験についての存在量における変化を、異なる色で強調した。一緒に、同定されたＲＮＡバイオマーカーは、９つの異なる細胞型及び１０の異なるウイルス感染にわたり上方調節される。このバイオマーカーの上方調節は、任意の観察可能な症状の十分に前である感染後４時間という早期にインビトロで検出することができる。追加のバイオマーカーを、上に一般的に記載したのと同様の手順での本発明における使用のために同定し、選択してもよい。

【図９】図９は、感染細胞におけるバイオマーカー候補のｑＰＣＲを示す。ヒト肺細胞（Ａ５４９）を、インフルエンザウイルス（左）又は水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ、右）のいずれかに２４時間にわたり偽感染又は感染させた。ＲＮＡを収集し、ｑＰＣＲを使用して定量化した。結果を「偽を上回る倍率変化」として示し、点線は感染の間に変化がないことを示す。ＩＦＩＴ２は、感染のグローバルマーカーであるＲＮＡの例であり、図８において図示する通りである。この例において、ＮＥＡＴ１はＶＳＶをインフルエンザから区別しうる、及びＯＡＳ１はインフルエンザをＶＳＶから区別しうる。

【図１０】図１０は、ヒト唾液からバイオマーカーを増幅及び検出するために使用される最適化工程の概略図を示す。工程３．１、２μＬのヒト唾液からのＲＮＡを成功裏にＤＮＡに逆転写させて、カスタマイズされたＲＴ－ＲＰＡキットを使用して増幅させた。反応を一定の３７℃で２０分以内に達成させた。工程３．２、感染についての潜在的バイオマーカーの成功裏の検出時に、異なる長さ及び配列を伴う複数のプライマーセットを設計してバイオマーカー増幅を最適化させた。最も高い増幅効率（ゲル画像上のバンドの強度により反映される）をもたらしたプライマーセットを、実際の診断において使用されるように選んだ。工程３．３、前の工程からの選択されたプライマーを、アダプター配列を保有するように改変し、側方流動アッセイテストストリップ及び金ナノ粒子レポータープローブへの下流ハイブリダイゼーションを可能にする。３７℃で２０分間にわたるＲＴ－ＲＰＡ増幅後、結果として得られたアンプリコンは、アダプター配列及び標的バイオマーカーからの配列の両方を含む。最終反応産物を次に、可視化のためにテストストリップに直接的に適用することができる。

【図１１】図１１は、相補的ＤＮＡ結合が、視覚的な読み出しのために凝集する核酸「サンドイッチ」を形成することを実証する。増幅されたバイオマーカーは、特定の一本鎖オーバーハングアダプターにより隣接される二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）領域を有する。このバイオマーカーを伴う溶液を、金ナノ粒子レポーターと混合し、それ自体を、増幅されたバイオマーカーのアダプターに相補的な一本鎖ＤＮＡアダプター及びニトロセルロース上のコントロール捕捉プローブにコンジュゲートさせる。相補的ＤＮＡ塩基対合の機構に起因して、これらのオーバーハングＤＮＡアダプター鎖が、膜を通じて流れる溶液中で相互作用するため、それらは、ｓｓＤＮＡコンジュゲート金ナノ粒子及び核酸「サンドイッチ」を形成する静止オリゴ捕捉プローブと結合してｄｓＤＮＡ構造を形成する（図４Ａ）。ますます多くのこれらのレポーター増幅バイオマーカー捕捉プローブサンドイッチ構造が形成し、凝集するにつれて、目に見えるピンクシグナルが、標的検出ゾーン（Ｂ）中のニトロセルロース上に出現し、本来のサンプル中でのそのバイオマーカーの存在を示している。ここで、左端のピンク点は、パネルＡ中に図示される複合体を表しており、第２のピンク点は、金レポーター単独でその相補的なプローブに結合しているコントロールである。このコントロールによって、サンプルがストリップ上を正しく流れたことが検証される。

【図１２】図１２は、合成ＲＴ－ＲＰＡ産物の１０倍希釈物で実行された一連のテストストリップの比色画像を示す。

【図１３Ａ】図１３Ａ～Ｄは、その一実施形態における使用の容易さのための外部カバーを有する側方流動アッセイテストストリップを示す。

【図１３Ｂ】同上。

【図１３Ｃ】同上。

【図１３Ｄ】同上。

【図１４】図１４は、その本発明の一実施形態において抗体ベースの捕捉機構を組み込ん

だ側方流動アッセイの一般的な概略図を示す。
【図１５】図１５は、バイオマーカーの検出のための例示的な検査室ベースのテスト及び側方流動テストの一般的な流れ図を示す。
【図１６】図１６は、バイオマーカー候補のためのプライマーを設計及び確証するためのフローチャート図を示す。図１６の開示に関して参照により本明細書中に組み込まれる、米国仮出願第６２／９３４，８７３号及び第６３／００６５６１号において記載されているシステム。
【図１７】図１７Ａ～Ｂ：宿主ＲＮＡバイオマーカーが、感染細胞の最初期の免疫応答から由来する遺伝子転写物であることを示す。ヒートマップを、公開されているＲＮＡシークエンシングデータセットから生成したが、異なる病原体を用いた培養ヒト細胞の感染時での特定のＲＮＡ種の発現変化のレベル（左のカラーコード）を示す（最上部）。全ての場合において、偽感染（－）細胞及び感染（＋）細胞を比較する。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２及びインフルエンザＡ特異的バイオマーカーの一部を、オレンジ色及び緑色の強調されたボックス中に示す。
【図１８】図１８は、多様な型の感染への応答において上方調節され、ヒト唾液中で検出可能である種々のＲＮＡバイオマーカーを示す。（Ａ）ヒートマップを、公開されているＲＮＡシークエンシングデータセットから生成したが、異なる病原体を用いた培養ヒト細胞の感染時での特定のＲＮＡ種の発現変化のレベル（下のカラーコード）を示す（最上部）。（Ｂ）全ての場合において、偽感染（－）細胞及び感染（＋）細胞を比較する。ここでは、本発明者らは、感染性疾患ユニットにおける３人の患者からの唾液サンプルを有する。これらは、真菌（患者１；コクシジオイデス）、ウイルス（患者２；水痘帯状疱疹ウイルス）、及び細菌（患者３；大腸菌）のいずれかでの急性感染症を表す。定量的ＲＴ－ＰＣＲを行い、健康な唾液コントロールと比べた、本発明者らのバイオマーカーＲＮＡの８つの倍率変化を測定した。Ｙ軸上の対数目盛に注意すること。これらのバイオマーカーが、健康な個人の唾液と比較し、感染した個人の唾液中で１０～１０，０００倍高いレベルで見出されることを示している。また、１つの型の感染を他から区別できうる唾液バイオマーカー、例えば真菌感染には応答しないが、しかし、ウイルス感染において１００，０００倍上方調節されるＥＧＲ１などがある。
【図１９】図１９は、宿主バイオマーカーの上方調節を、マルチプレックスＲＴ－ｑＰＣＲ反応において検出することができることを示す。ヒト肺細胞（Ａ５４９）を、インフルエンザウイルスで偽感染又は感染させ、ＲＮＡを、感染後２４時間に細胞ライセートから精製した。ＲＮＡを次に、Taqmanプローブ及び化学を使用してＲＴ－ｑＰＣＲ反応に供した。Ｘ軸上に示すバイオマーカーを、表４において収載されているプラ■■イマー及びプローブを使用し、シングルプレックス（黒色バー）又はマルチプレックス（オレンジバー）反応において測定した。相対的なｍＲＮＡ発現（Ｙ軸）を、最初に宿主コントロール遺伝子を使用してサンプルを内部標準化し、次に偽感染サンプルと比較することにより計算した。
【図２０】図２０は、一部の宿主バイオマーカーの上方調節がウイルスＲＮＡ検出に先行することを示す。ヒト肝細胞株（Ｈｕｈ７）を、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２コロナウイルスで偽感染又は感染させた。ＲＮＡを、感染後０、２、４、８、１２、２４、及び４８時間で細胞ライセートから精製した（Ｘ軸）。ＲＮＡを次に、表４において収載しているプラ■■イマー及びプローブを使用してＲＴ－ｑＰＣＲに供した。相対的なｍＲＮＡ発現（Ｙ軸）を、最初に宿主コントロール遺伝子を使用してサンプルを内部標準化し、次に偽感染サンプルと比較することにより計算した。バイオマーカーの完全なパネルを左側に示しているのに対し、バイオマーカーのサブセットを右側に示しており、感染の初期段階（青色）、感染の後期段階（緑色）において上方調節されているバイオマーカー、及び上方調節されていない宿主コントロールバイオマーカー（灰色）を強調している。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２核タンパク質遺伝子（Ｎ２）の検出をまた、赤色で示している。
【図２１】図２１は、抗体捕捉スキームを伴う例示的な側方流動ストリップを示す。側方流動ストリップを、図４の概略図に従ってストリッピングした。模倣アンプリコンを、側

方流動ストリップの感度をテストするために生成した。「過剰」線は、過剰な抗ＦＩＴＣコンジュゲート金ナノ粒子を捕捉している。「コントロール」線は、ＦＩＴＣ及びビオチンとコンジュゲートされた模倣アンプリコンを捕捉している。「テスト」線は、ＦＩＴＣ及びＤＩＧとコンジュゲートされた模倣アンプリコンを捕捉している。

【図２２】図２２は、感染の宿主バイオマーカーを検出するためのプライマーを含む表３を示す。候補バイオマーカーのサブセットを、プライマーの最適化のために選んだ。収載しているプライマーセットを使用してＲＴ－ｑＰＣＲを行い、プライマー効率、Ｃｔ値、融解曲線、及び２つの宿主コントロールバイオマーカー（ＲＡＣＫ１又はＣＡＬＲ）に関する対数倍率変化を最適化した。未処理ヒト肺細胞（Ａ５４９）中での発現を、インターフェロン処理Ａ５４９細胞（Ａ５４９＋ＩＦＮ）又はインフルエンザウイルス感染Ａ５４９細胞（Ａ５４９＋ｆｌｕ）のいずれかと比較した。

【図２３】図２３は、宿主バイオマーカーのマルチプレックス検出用のプライマー及びプローブを含む表４を示す。表３からの候補バイオマーカーのサブセットを、それらの大きな倍率変化に基づいて選んだ。Taqmanプローブを、ＲＴ－ｑＰＣＲ反応におけるTaqman蛍光化学と適合性があるように、各々のプライマーセットについて設計した。バイオマーカーを、多重化のために適合性があるように、Ｃｔ値に基づいて３通りにグループ化した。

【図２４】図２４は、等温ＲＴ－ＲＰＡを使用して宿主バイオマーカーを増幅するためのプライマーを含む表５を示す。候補バイオマーカーのサブセットを、ＲＴ－ＲＰＡ反応の最適化のために選んだ（Ａ）。図１６において提示する条件を満たすプライマーセットを次に、本発明の側方流動アッセイとの適合性のために５’修飾（ＦＩＴＣ、ビオチン、又はＤＩＧ）を含むように修飾させた（Ｂ）。

【図２５】図２５は、ＲＴ－ＲＰＡ反応からの増幅産物を側方流動ストリップ上で検出することができることを示す。（Ａ）二次抗ウサギ抗体（金ナノ粒子過剰線）、ストレプトアビジン（コントロール線）、又は抗ＤＩＧ抗体（バイオマーカー線）でストリッピングされた側方流動ストリップを使用し、示したＲＴ－ＲＰＡ反応を分解した。サンプル＃１はＰＢＳだけを含み、ＲＴ－ＲＰＡ反応産物は含まないのに対し、全ての他のサンプルはＲＴ－ＲＰＡ反応（２０分反応）産物を含む。ＲＴ－ＲＰＡを、インフルエンザ感染ヒト肺細胞（Ａ５４９）からの精製ＲＮＡをテンプレートとして使用して行った。（Ｂ）パネルＡ中に記載する側方流動ストリップを使用し、プライマーセット自体が偽陽性シグナルを産生しないことを確認した。示したプライマーセットを、ＲＴ－ＲＰＡ反応の同じ濃度でＰＢＳと混合し、ストリップ上で実行した。

【発明を実施するための形態】

【００２１】

本発明の技術は、新規の側方流動アッセイを通じた無症候性対象における病原体及び／又は感染の早期検出のためのシステム、方法、及び組成物を含みうるが、それは、好ましい実施形態において、病原体又は感染への応答において対象の自然免疫系により産生され、唾液中に存在する１つ又は複数の宿主ＲＮＡ転写物バイオマーカー（コーディングまたは非コーディング）を検出するように構成された迅速自己投与テストストリップを含みうる。

【００２２】

図１Ｂにおいて一般的に示すように、一実施形態において、本発明の技術は、対象における早期感染の検出のためのシステム、方法、及び組成物を含みうるが、それは少なくとも以下を含みうる：毛細管作用を介して液体の流れを可能にするように構成された、繊維状又は紙ベースの側方流動ストリップ（２）を好ましくは含みうる側方流動アッセイテストストリップデバイス（１）（また、テストストリップ、又は側方流動ストリップとして言及する）；２）事前に調製された反応シリンダー（３）（対象から液体サンプルを受けるように構成され、ＲＴ－ＲＰＡ反応を実施するように事前に調製された回収容器を含みうる）中で生じうるＲＴ－ＲＰＡ（逆転写リコンビナーゼポリメラーゼ増幅）反応；及び３）１つ又は複数のＲＮＡバイオマーカー転写物であって、流体サンプル（ 好ましい実

施形態において、対象により提供される唾液サンプルを含みうる）中で供給される、バイオマーカーとしても一般的に言及される。

【００２３】

患者の免疫応答（一般的に自然免疫応答又は感染時に上方調節される任意の他の細胞経路）により産生され、唾液中に見出される特定の標的ＲＮＡ転写物又はバイオマーカー（９）は、早期感染を示しうる。結果として、本発明の技術の一実施形態は、これらの標的ＲＮＡ転写物の検出のためのシステム、方法、及び組成物を含みうるが、それは、対象における早期感染についてのバイオマーカーとして作用しうる。しかし、上に記述するように、この実施形態において、ヒト対象により提供される典型的な流体サンプル中に存在する標的ＲＮＡ転写物バイオマーカーは、一般的に、低い濃度で存在し、検出されるために増幅を要求する。この物理的制限を克服するために、図１Ｂ中でさらに示すように、本発明の一実施形態において、対象は、流体サンプル（この場合では唾液サンプルを含みうる）を反応シリンダー（３）中に沈着させ、ここで、それは増幅工程を受けうる。具体的には、反応シリンダー（３）は、流体サンプルを受けうるが、そこで、それはＲＴ－ＲＰＡ反応を経て、流体サンプル中に存在するＲＮＡバイオマーカー転写物を増幅させうる。この好ましい実施形態において、反応シリンダー（３）は、ＲＴ－ＲＰＡ反応が反応シリンダー内で進行することを可能にしうる量の、事前に調製されたタンパク質、酵素、塩、及び他の試薬で事前に充填させてもよい。図１Ａにおいて示すように、反応シリンダー（３）は、Ｃ３スペーサーエレメントをさらに含みうる標的ＲＮＡバイオマーカー転写物に向けられたプライマーで事前に充填してもよい。別の好ましい実施形態において、反応シリンダー（３）は、１つ又は複数のコンジュゲートレポータープローブ（７）、例えばコンジュゲート金ナノ粒子（ＧＮＰ）レポータープローブなどでさらに事前に充填してもよい。

【００２４】

他の実施形態において、コンジュゲートレポータープローブ（７）、例えばコンジュゲート金ナノ粒子（ＧＮＰ）レポータープローブなどは、反応シリンダー中に事前に充填される代わりに、事前に埋め込まれ、乾燥され、凍結乾燥され、又は他の方法としてコンジュゲートパッドに付着されうる。この特定の実施形態は、異なるコンジュゲートレポータープローブを伴う、複数の事前に埋め込まれたコンジュゲートパッドを有する側方流動アッセイテストストリップの生成を可能にしうる（７）。

【００２５】

再び、図１Ｂにおいて示すように、流体サンプルは、対象により手動で、又は別の自動化もしくは半自動化過程を通じて反応シリンダー（３）中に導入されうるが、流体サンプル中に存在する１つ又は複数のＲＮＡバイオマーカー転写物が、ＲＴ－ＲＰＡ成分（反応シリンダー（３）中に事前に充填された修飾プライマーを含む）と相互作用して、ＲＴ－ＲＰＡ増幅反応を促進する。重要なことに、この好ましい実施形態において、反応シリンダー（３）は、等温的にＲＴ－ＲＰＡ反応を生成するように構成されうる。

【００２６】

一実施形態では、反応シリンダー（３）は、ＲＴ－ＲＰＡ反応がほぼ室温（～２５℃）又は体温（～３７℃）で等温的に進行するために必要な、事前に調製されたタンパク質、酵素、塩、及び他の試薬を含みうるが、手で持つことにより、核酸を増幅するために一般的に要求される検査室装置についての必要性が排除される。１つの好ましい実施形態において、ＲＴ－ＲＰＡ反応は、反応シリンダー（３）中で、ほぼ３０分又はそれ以下の期間にわたり進行しうる。

【００２７】

図１Ａにおいて強調しているように、この等温ＲＴ－ＲＰＡ反応の結果は、この場合ではＣ－　３スペーサーを通じて、３’及び５’末端でのオーバーハング一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）領域と結合された、標的バイオマーカー配列（ＧＲＥＥＮ（１０））のハイブリッド二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）プローブを有する操作プローブを含みうる。図１ａ中で、ｄｓＤＮＡプローブの５’末端での第１のオーバーハングｓｓＤＮＡ領域は、アニーリ

ング領域（ＯＲＡＮＧＥ（１１））を含みうるが、第２のオーバーハングｓｓＤＮＡ領域は、ここでｄｓＤＮＡプローブの５’末端に示しており、標的捕捉領域（ＢＬＵＥ（１２））を含みうる。

【００２８】

一度、ＲＴ－ＲＰＡ反応が完了すると、反応シリンダー（３）の内容物を、１つ又は複数のコンジュゲートレポータープローブ（７）中に導入してもよく、それは、好ましい実施形態において、例えば、サンプル中の標的ＲＮＡバイオマーカー転写物の存在の観察可能な指標を産生することにより視覚レポーターとして作用しうる。上に示すように、コンジュゲートレポータープローブは、以下で考察するように、ハイブリッド二本鎖ＤＮＡ分子のアニーリング領域及びコントロール捕捉プローブ（２４）の両方に相補的な一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）分子（５）にコンジュゲートされたコンジュゲート金ナノ粒子（ＧＮＰ）（４）を含む。当然、ＧＮＰの使用は単に例示的である。なぜなら、種々の形状及びサイズの多様なメタロイドナノ粒子レポーターが、本発明の技術中に組み込まれうるためである。追加的な実施形態はまた、１つ又は複数の非メタロイドレポータープローブ、例えば蛍光レポーター、酵素レポーター、又は抗体レポーターなどを含みうる。

【００２９】

再び、図１Ａを参照すると、上で強調する好ましい実施形態において、このアニーリング領域は、チオール、ＰＥＧ$_{18}$、及びＰｏｌｙＡ構築物を通じてＧＮＰと結合されうる。注目すべきことに、この構成において、コンジュゲートＧＮＰレポータープローブが溶液中に、又は小さな表面積、例えば図１３において示す側方流動テストストリップ上の１つ又は複数の別々のバンドなどにおいて集中している場合、それらは視覚シグナルを提供しうるが、それは、この実施形態において、図１Ｂ及び１３において赤色バンドとして示される、着色バンドを含みうる。

【００３０】

図１Ｂにおいてさらに示すように、反応シリンダー（３）中での増幅反応において生成されたアニーリング領域及び標識捕捉領域を伴う標的ｄｓＤＮＡ転写配列を含むハイブリッドｄｓＤＮＡプローブ（６）は、ＤＮＡコンジュゲートＧＮＰレポータープローブと組み合わせてもよい。この実施形態において、最適な泳動用緩衝液の存在において、ハイブリッドＤＮＡ分子及びＤＮＡコンジュゲートＧＮＰレポータープローブの相補的領域をアニーリングさせて、凝集複合体を形成させてもよい（１３）。本開示から理解されるはずであるように、そのような凝集複合体は、予想される標的配列、この場合では早期感染を示すバイオマーカーが、両方ともサンプル中に存在し、反応シリンダー中に局在化するＲＴ―ＲＰＡ反応を介して増幅される場合にだけ形成しうる。

【００３１】

ここで図１Ａ～Ｂを参照すると、好ましい実施形態において、ＤＮＡコンジュゲートＧＮＰレポータープローブと結合したハイブリッドｄｓＤＮＡプローブ（６）により形成された凝集複合体を含む組み合わせ溶液を、側方流動ストリップに導入してもよい。好ましい実施形態において、この組み合わせ溶液を、好ましくはガラス繊維で作製されたコンジュゲートパッド（１４）領域中に導入してもよい。組み合わせ溶液は、毛細管作用を介して、膜、例えばニトロセルロース繊維膜などを通じて、側方流動ストリップの表面、好ましくはテストストリップのニトロセルロース膜（１５）の表面に埋め込まれている１つ又は複数の捕捉プローブを有する検出ゾーン（１７）を含みうる側方流動ストリップ（２）上の吸収パッド（１６）領域に向かって流れうる。テストストリップのニトロセルロース膜（１５）中に埋め込まれた捕捉プローブの位置及び方向を調整し、シグナル生成又はサンプル－プローブ相互作用を最適化してもよい。注目すべきことに、吸収パッド（１６）領域は、側方流動ストリップ（２）の遠位端に配置され、検出ゾーンを通じて、毛細管作用を介したサンプルの流れを促進する。

【００３２】

図１Ａにおいて強調するように、捕捉プローブは、側方流動ストリップのニトロセルロース表面中に埋め込まれた固定化ストレプトアビジンベース四量体（２１）を含みうる。

この固定化ストレプトアビジンベースは、ビオチン－ＴＥＧリンカー（２２）と結合させてもよく、それはさらに、ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブ上の標的捕捉領域に相補的でありうるｓｓＤＮＡ標的捕捉プローブ（８）配列と結合させてもよい。

【００３３】

再び、図１Ａにおいて示す好ましい実施形態において、ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブ（６）の標的捕捉領域を相補的捕捉プローブｓｓＤＮＡ配列（５）にアニーリングさせてもよく、ＤＮＡコンジュゲートＧＮＰレポータープローブにさらに結合されたハイブリッドｄｓＤＮＡプローブ（６）と結合された埋め込み「サンドイッチ」複合凝集体を形成する。図１Ａ～１Ｂにおいて見ることができるように、目的のバイオマーカーが存在する場合（即ち、対象における病原体感染を示すバイオマーカー）、「サンドイッチ」複合体は、側方流動ストリップに沿った別々の位置に固定化されうる。上に記述するように、本発明のＧＮＰレポータープローブは、溶液中で、又は側方流動ストリップ上に固定化された場合に赤色シグナルを産生する。そのようなものとして、特定の濃度の複合体凝集体が互いに近接して捕捉される場合、検出ゾーン（１７）内の目に見えるシグナルが生成されうるが、それは、この例示的な実施形態において、側方流動ストリップ上の赤色ピンクのバンドとして示される。検出ゾーン（１７）内のこの目に見えるシグナルは、標的病原体の存在を示す陽性結果、又は対象における感染の早期徴候を示しうる。注目すべきことに、上に一般的に記載するこの過程は、完了まで実行して識別可能なシグナルを提供するのに１０分未満、一部の例において、３分未満を要しうる。

【００３４】

図１Ａにおいてさらに示すように、検出ゾーン（１７）内に固定化されていない任意の非結合ＧＮＰレポータープローブは、側方流動ストリップ（２）を通じて遠位吸収パッド（１６）に向かって流れ続け、側方流動ストリップの表面上のコントロール領域に固定化されたコントロール捕捉プローブ（２４　）にアニーリングしうる。この様式において、コントロール領域中に固定化された非結合ＧＮＰレポータープローブはまた、システムについて陽性コントロールを提供する、目に見えるシグナルを産生する。

【００３５】

代替の実施形態において、本発明は、抗体ベースの捕捉機構を有する側方流動アッセイストリップを含みうる。図１Ａにおいて記載する側方流動アッセイと同様に、この等温ＲＴ－ＲＰＡ反応の結果は、コントロールバイオマーカーとして作用しうる増幅ＲＰＡ産物、及び感染バイオマーカーとして作用しうる別の増幅ＲＰＡ産物を含みうる。一度、ＲＴ－ＲＰＡ反応が完了すると、反応シリンダー（３）の内容物を、１つ又は複数のコンジュゲート抗体レポータープローブ中に導入してもよく、それは、好ましい実施形態において、例えば、サンプル中の標的ＲＮＡバイオマーカー転写物の存在の観察可能な指標を産生することにより視覚レポーターとして作用しうる。より具体的には、図１４において示すように、等温ＲＴ－ＲＰＡ反応は、少なくとも２つの増幅ＲＰＡ産物、又はアンプリコン、すなわち、プローブ捕捉領域及び標的捕捉領域をそれぞれ形成する改変５’ｓｓＤＮＡオーバーハング領域をそれぞれ有するコントロールバイオマーカー及び感染バイオマーカーを生成しうる。この実施形態において、コントロールバイオマーカーは、５’ＦＩＴＣフォワードｓｓＤＮＡオリゴ（緑）及び５’ビオチンリバースｓｓＤＮＡオリゴ（オレンジ）と結合したｄｓＤＮＡ転写領域を含みうる。この実施形態の感染バイオマーカーは、５’ＦＩＴＣフォワードｓｓＤＮＡオリゴ（緑及びピンク）及び５’ＤＩＧ　ｓｓＤＮＡリバースオリゴ（青）と結合したｄｓＤＮＡ転写領域を含みうる。

【００３６】

図１４においてさらに示すように、ＧＮＰは、抗ＦＩＴＣ（フルオレセインイソチオシアネート）抗体、好ましくはウサギにおいて産生された抗ＦＩＴＣ抗体（１９）とコンジュゲートされうる。また、図１４において示すように、ストレプトアビジンはまた、上に一般的に記載するように、膜（１５）上にストリッピングし、増幅ＲＰＡ産物中に存在するコントロールバイオマーカーアンプリコンを捕捉しうる。この実施形態において、抗ＤＩＧ（ジゴキシゲニン）抗体（２０）、好ましくはマウスにおいて産生された抗ＤＩＧ抗

体はまた、側方流動膜（１５）上にストリッピングし、増幅ＲＰＡ産物中に存在する感染バイオマーカーアンプリコンを捕捉してもよい。

【００３７】

図１４においてさらに示すように、増幅反応において生成されたハイブリッドｄｓＤＮＡコントロール及び感染アンプリコンプローブは、抗ＦＩＴＣ抗体コンジュゲートＧＮＰレポータープローブと組み合わせてもよい。この実施形態において、抗ＦＩＴＣ抗体は、コントロール及び感染バイオマーカーの５’ＦＩＴＣフォワードオリゴに結合して、凝集複合体を形成しうる（１３）。この実施形態において、凝集複合体（１３）を、本発明の側方流動ストリップ（２）にさらに導入してもよい。好ましい実施形態において、この組み合わせ溶液を、好ましくはガラス繊維で作製されたコンジュゲートパッド（１４）領域中に導入してもよい。組み合わせ溶液は、毛細管作用を介して、膜、例えばニトロセルロース繊維膜などを通じて、側方流動ストリップの表面、好ましくはテストストリップのニトロセルロース膜（１５）の表面に埋め込まれている１つ又は複数の捕捉プローブを有する検出ゾーン（１７）を含みうる側方流動ストリップ（２）上の吸収パッド（１６）領域に向かって流れうる。テストストリップのニトロセルロース膜（１５）中に埋め込まれた捕捉プローブの位置及び方向を調整し、シグナル生成又はサンプル－プローブ相互作用を最適化してもよい。注目すべきことに、吸収パッド領域は、側方流動ストリップ（２）の遠位端に配置され、検出ゾーンを通じて、毛細管作用を介したサンプルの流れを促進する。

【００３８】

上に記述するように、捕捉プローブは、側方流動ストリップのニトロセルロース表面中に埋め込まれた固定化ストレプトアビジンベース四量体（２１）を含みうる。この固定化ストレプトアビジンベースは、ビオチン－ＴＥＧリンカー（２２）と結合させてもよく、それはさらに、ハイブリッドｄｓＤＮＡプローブ、好ましくは５’ビオチン－リバースオリゴ上の標的捕捉領域に相補的でありうるｓｓＤＮＡ標的捕捉プローブ配列と結合させてもよい。さらに、捕捉プローブは、５’ＤＩＧ－リバースオリゴに結合するように構成されうる固定化抗ＤＩＧ抗体を含みうる。この構成において、コントロール及び感染バイオマーカーアンプリコンは、それらのそれぞれの捕捉プローブにより、それらのそれぞれの位置に結合させてもよい。上に記述するように、本発明のＧＮＰレポータープローブは、溶液中で、又は側方流動ストリップ上に固定化された場合に赤色シグナルを産生する。そのようなものとして、特定の濃度の複合体凝集体が互いに近接して捕捉される場合、検出ゾーン（１７）内の目に見えるシグナルが生成されうる。検出ゾーン（１７）内のこの目に見えるシグナルは、標的病原体の存在を示す陽性結果、又は対象における感染の早期徴候を示しうる。注目すべきことに、上に一般的に記載するこの過程は、完了まで実行して識別可能なシグナルを提供するのに１０分未満、一部の例において、３分未満を要しうる。

【００３９】

図１Ａにおいてさらに示すように、検出ゾーン内に固定化されていない任意の非結合ＧＮＰレポータープローブは、側方流動ストリップ（２）を通じて遠位吸収パッドに向かって流れ続け、非結合抗体コンジュゲートＧＮＰレポータープローブを捕捉するように構成されている、側方流動ストリップの表面上のコントロール領域に固定化された抗ウサギコントロール捕捉プローブ（２３）にアニーリングしうる。この様式において、コントロール領域中に固定化された非結合ＧＮＰレポータープローブはまた、システムについて陽性コントロールを提供する、目に見えるシグナルを産生しうる。

【００４０】

当然、このシステムは、多様な実用的な適用に適応されうる。例えば、システムは、側方流動ストリップ上の複数の検出ゾーンで複数の別個の捕捉プローブに対応する複数のバイオマーカーＲＮＡ転写物を検出するように改変されうる。さらに、そのようなプローブ及びそれらの設計は、単に例示的であることに注意すべきである。なぜなら、多様な異なるプローブ構成、ならびにプローブ生成シグナルが、本明細書中で一般的に記載されるよ

うにシステム内で互換的でありうるためである。

【００４１】

例えば、図４において示すように、一実施形態において、上に記載する側方流動検出システムを使用し、変動する程度の感度を伴って、既知又は未知の病原体による対象の感染を検出してもよい。他の実施形態において、上に記載する側方流動検出システムを使用し、病原体の種類、例えば細菌、ウイルス、又は真菌などを決定してもよい。追加の実施形態において、上に記載する側方流動検出システムを使用し、特定の病原体又はそれらの血清型を決定してもよい。

【００４２】

一実施形態において、本発明の技術は、それを必要とする対象における病原体特異的感染の検出のための新規のシステム、方法、及び組成物を含みうる。１つの好ましい実施形態において、本発明の技術は、ヒト対象における特定の病原体の感染の検出を提供しうる。この好ましい実施形態において、生物学的サンプルは、好ましくは唾液サンプルを含みうるが、特定の病原体での感染についての１つ又は複数のバイオマーカーを含みうる対象により提供されうる。この実施形態において、唾液サンプルは、例えば、現場での又は現場外での臨床検査室によりさらに処理されうるが、それにおいて、唾液サンプル中に存在するＲＮＡ分子がさらなるテストのために抽出される。抽出ＲＮＡは次に、病原体のバイオマーカーについてのｑＲＴ－ＰＣＲ過程を経る。一実施形態において、標的病原体の成分に向けられることが公知であるプライマーシーケンサーの１つ又は複数を使用し、標的病原体により産生される特定のバイオマーカーを同定してもよい。この実施形態において、対象は、病原体バイオマーカーの時間経過を生成するために、ＲＮＡ抽出及びｑＲＴ－ＰＣＴ処理のための複数の生物学的サンプルを提供しうる。これらの複数のサンプルは、対象における病原体への曝露の初期点からの、標的病原体バイオマーカーの定量化されたベースライン進行を提供しうる。前述のことから理解できるように、そのような過程は、複数の標的病原体について実施されうるが、複数の対象を使用して連続してさらに行い、標的病原体の時間経過バイオマーカーのライブラリーを生成してもよい。

【００４３】

上に記述するように、本発明の技術によって、ウイルスを検出することができる前に、及び感染の任意の症状が生じうる十分に前に、対象の生物学的サンプル中に存在しうる宿主由来のバイオマーカーの検出が可能になりうる。１つの好ましい実施形態において、ＲＮＡは、生物学的サンプルから抽出されうるが、それは、この場合において、宿主由来の感染のバイオマーカーを含み、さらにｑＲＴ－ＰＣＲに供される唾液サンプルである。この実施形態において、対象は、宿主由来バイオマーカーの時間経過を生成するために、ＲＮＡ抽出及びｑＲＴ－ＰＣＴ処理のための複数の生物学的サンプルを提供しうる。再び、複数のサンプルは、宿主由来のバイオマーカー、例えば病原体への曝露の初期点から、及びインキュベーション期間を通して、標的病原体への応答において宿主の自然免疫応答により生成されるＲＮＡバイオマーカーなどの定量化されたベースライン進行を提供しうる。再び、前述のことから理解できるように、そのような過程は、複数の標的病原体について実施されうるが、複数の対象を使用して連続してさらに行い、時間経過の宿主由来バイオマーカー、好ましくは標的病原体への応答において産生される宿主由来ＲＮＡバイオマーカーのライブラリーを生成してもよい。潜伏期間の間に生じる宿主の自然免疫応答、及び標的病原体自体の両方からのＲＮＡマーカーを組み合わせることにより、本発明は、種々の病原体による感染についての検出ウィンドウを拡大しうる。

【００４４】

１つの好ましい実施形態において、本発明の技術は、ヒト対象における新型コロナウイルスＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＣＯＶＩＤ－１９）の感染の検出、特に、ヒト対象における新型コロナウイルスＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＣＯＶＩＤ－１９）の感染への応答において生成される感染の宿主由来バイオマーカーを提供しうる。上に記述するように、この実施例は、ＣＯＶＩＤ－１９コロナウイルスの場所において組み込まれうる多数の異なる病原体の単なる例示である。図１５において示すように、この好ましい実施形態において、生

物学的サンプルは、好ましくは唾液サンプルを含みうるが、ＣＯＶＩＤ－１９感染についての１つ又は複数のバイオマーカーを含みうる対象により提供されうる。この実施形態において、唾液サンプルは、例えば、現場での又は現場外での臨床検査室によりさらに処理されうるが、それにおいて、唾液サンプル中に存在するＲＮＡ分子がさらなるテストのために抽出される。抽出ＲＮＡは次に、ｑＲＴ－ＰＣＲ過程を経て、ここで、病原体のバイオマーカー、この場合においてはＣＯＶＩＤ－１９コロナウイルスが同定される。実施形態において、以下の表２（配列番号４６９～４８０）中で同定されたプライマーシーケンサーの１つ又は複数を使用し、ＣＯＶＩＤ－１９コロナウイルスにより産生される特定のバイオマーカーを同定してもよい。この実施形態において、対象は、病原体バイオマーカーの時間経過を生成するために、ＲＮＡ抽出及びｑＲＴ－ＰＣＴ処理のための複数の生物学的サンプルを提供しうる。例えば、図１５Ｂにおいて示すように、複数のサンプルは、病原体への曝露の初期点からの病原体バイオマーカーの定量化されたベースライン進行を提供しうる。

【００４５】

上に記述するように、本発明の技術によって、対象の生物学的サンプル中に存在しうる宿主由来のバイオマーカーの検出が可能になりうるが、ウイルスを、感染の任意の症状が生じうる前に検出することができる。１つの好ましい実施形態において、ＲＮＡは、生物学的サンプルから抽出されうるが、それは、この場合において、宿主由来の感染のバイオマーカーを含み、さらにｑＲＴ－ＰＣＲに供される唾液サンプルである。この実施形態において、対象は、宿主由来バイオマーカーの時間経過を生成するために、ＲＮＡ抽出及びｑＲＴ－ＰＣＴ処理のための複数の生物学的サンプルを提供しうる。例えば、図１５Ｂにおいて示すように、複数のサンプルは、宿主由来のバイオマーカー、例えば病原体への曝露の初期点から、及びインキュベーション期間を通して、ＣＯＶＩＤ－１９病原体への応答において宿主の自然免疫応答により生成されるＲＮＡバイオマーカーなどの定量化されたベースライン進行を提供しうる。再び、図１５において示すように、潜伏期間の間に生じる宿主の自然免疫応答、及びＣＯＶＩＤ－１９コロナウイルス自体の両方からのＲＮＡマーカーを組み合わせることにより、本発明は、ＣＯＶＩＤ－１９コロナウイルス感染についての検出ウィンドウを拡大しうる。

【００４６】

ここで図１５Ｃを参照し、別の実施形態において、側方流動アッセイストリップは、ＣＯＶＩＤ－１９感染の１つ又は複数の宿主由来バイオマーカー、好ましくはＣＯＶＩＤ－１９感染の宿主由来ＲＮＡバイオマーカー、ならびに　ＣＯＶＩＤ－１９感染症のバイオマーカーを検出するように構成されうる。図１５Ｃにおいて記述するように、側方流動アッセイストリップは、上に記載するｑＲＴ－ＰＣＲにより確立された、感染の時間経過の間でのそれらの有病率に従って連続的に配置されたＣＯＶＩＤ－１９感染の複数の宿主由来ＲＮＡバイオマーカーを含むように構成されうる。この様式において、本発明の側方流動アッセイストリップは、病原体、例えばＣＯＶＩＤ－１９コロナウイルスなどに曝露された対象を同定することができるだけでなく、選択された感染の時間経過に対応する１つ又は複数のバイオマーカーが埋め込まれた連続検出ラインを含みうる。この好ましい実施形態において、対象は、生物学的サンプル、好ましくは唾液サンプルを提供しうる。唾液サンプルは、増幅反応を経て、バイオマーカーの量を増加させることが可能であり、次に、上に一般的に記載するように、側方流動アッセイストリップに適用される。この実施形態において、ＣＯＶＩＤ－１９感染の宿主由来ＲＮＡバイオマーカーは、標的捕捉プローブにより固定化されて、固定化された凝集複合体を形成しうるが、それは次に、再び、上に一般的に記載するように、目に見える単一を生成しうる。

【００４７】

注目すべきことに、この実施形態において、ＣＯＶＩＤ－１９バイオマーカーはまた、標的捕捉プローブにより固定化されて、固定化された凝集複合体を形成しうるが、それは次に、宿主由来のＲＮＡバイオマーカー視覚シグナルとは別の目に見える単一を産生しうる。この様式において、対象又は医療従事者は以下を迅速に特定できるであろう：１）対

象が、この場合においては、ＣＯＶＩＤ－１９コロナウイルスに曝露されているか否か；２）対象がＣＯＶＩＤ－１９コロナウイルスに感染しているが、しかし、依然としてウイルスの感染サイクルの潜伏期間中にあるか否か；３）ＣＯＶＩＤ－１９コロナウイルスへの曝露からのおおよその時間；４）ＣＯＶＩＤ－１９コロナウイルスバイオマーカーでの感染が伝染性でありうるおおよその時間。さらに理解することができるように、追加の実施形態において、側方流動アッセイストリップは、前症候性の対象、ならびに無症候性の対象を同定するようにさらに構成されうる。最も重要なことに、側方流動アッセイの結果によって、感染の早期同定が可能になり、適当な検疫及び接触者追跡プロトコールが促進されうる。

【００４８】

ここで一般的に記載されている本発明は、以下の実施例への参照により、より容易に理解されるであろうが、実施例は、本発明の実施形態の特定の態様の図示の目的だけのために含まれる。実施例によって本発明を限定することを意図しない。なぜなら、当業者は、上の教示及び以下の実施例から、他の技術及び方法が、特許請求の範囲を満たすことができ、請求項に係る発明の範囲から逸脱することなく用いることができることを認識しうるからである。実際に、本発明を、その好ましい実施形態への参照を伴って特に示し、記載してきた一方で、形態及び詳細における種々の変化を、添付の特許請求の範囲により包含される、本発明の範囲から逸脱することなく、それにおいて作ることができることが当業者により理解されるであろう。

実施例

【００４９】

実施例１：感染の標的バイオマーカーの同定。

一実施形態において、本発明は、１つ又は複数のＲＮＡ転写物バイオマーカーの同定及び使用のためのシステム、方法、及び組成物を含みうる。図７において示すように、１つの好ましい実施形態において、第１の組織培養実験（左）を確立及びテストし、実験的感染の間に上方調節されうる、及び、また、標的細胞から分泌されうる標的ＲＮＡ転写物を同定することができる。上方調節されるＲＮＡは、候補バイオマーカーとして使用し、一般的に上に記載するように側方流動システムとの互換性のために操作されうる。並行して、健康な及び感染したヒト唾液からのＲＮＡは、ヒトにおける感染のＲＮＡバイオマーカーを同定するために、臨床治験（右）において特徴付けられうる。これらのバイオマーカーは、組織培養実験においてまだ同定されていない場合、上に一般的に記載するように、側方流動システムとの互換性のためである。

【００５０】

実施例２：初期宿主バイオマーカーの同定。

図８において一般的に示すように、本発明の一実施形態は、バイオインフォマティクスメタアナリシスを使用した、感染についての初期宿主バイオマーカーの同定を含む。感染への応答において産生された宿主核酸バイオマーカーを早期段階で同定するために、本発明者らは、公的に利用可能なトランスクリプトームデータセットを検索した。選択されたデータセットは、複数の時間点で異なるウイルスにより感染された種々のヒト組織型を使用して生成されたデータセットに向けられた。本発明者らは、標準化されたバイオインフォマティクスパイプラインを使用してこれらのデータセットを分析し、感染への応答において上方調節されるヒトコーディング及び非コーディングＲＮＡを同定した。これらのデータは、異なる試験にわたって一般に上方調節されている宿主ＲＮＡ転写物を要約する。一般に上方調節されたＲＮＡ転写物のこのリストは、例示的な候補ＲＮＡ転写物バイオマーカーで構成された。これらのＲＮＡ転写物の上方調節は、進行中の感染のシグナルとなる（図１中の実施例）。

【００５１】

同時に、本発明者らはまた、健康な臨床のヒト参加者の唾液サンプルから精製されたＲＮＡを収集し、配列決定した。バイオインフォマティクスデータ分析を通じて、健康な参加者と感染した患者の間で有意に異なるＲＮＡ転写物が同定され、分類された。これらの

臨床データセットを次に使用し、潜在的なバイオマーカーを除去してもよい。まとめると、宿主ＲＮＡバイオマーカーの最終リストは、唾液を非侵襲的診断材料として使用し、健康な個人を、種々の病原体（ウイルス、細菌、真菌、及び原生生物）により感染された対象から区別する可能性を有しうる。

【００５２】

実施例３：標的バイオマーカーの検証。

図９において一般的に示すように、本発明の一実施形態は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）プロトコールを使用した標的バイオマーカーの検証を含む。上で概説する方法を使用して同定されたバイオマーカーは、組織培養感染実験においてさらに確認されうる。ＲＮＡの逆転写定量ＰＣＲ（ＲＴ－ｑＰＣＲ）によって、非感染細胞と比較した感染細胞における「倍率変化」として、候補バイオマーカーの上方調節の特異的な定量化が可能になる。そのような情報は、所与のバイオマーカーに関して、側方流動アッセイスティックの検出感度を評価する際に役立つ。

【００５３】

６つの例示的なバイオマーカー候補だけをここに示している一方で、そのようなリストは、本発明で使用されうるバイオマーカーの数を制限するものとして解釈すべきではない。実際に、本明細書中に記載するように、本発明中に組み込まれうる多数のバイオマーカー候補が存在しうる。

【００５４】

実施例４：体液サンプルからの感染バイオマーカーの等温増幅。

インビトロでの感染の間に上方調節されるＲＮＡバイオマーカーの成功裏の検証時に、標的ＲＮＡバイオマーカーを１つ又は複数の最適化過程に供して、ヒト唾液からのバイオマーカーの成功裏の等温増幅及び側方流動アッセイスティックでの可視化を確実にしうる。

【００５５】

図１０において一般的に示すように、体液サンプル中の標的ＲＮＡ転写物バイオマーカーの存在は、好ましい実施形態において唾液を含みうるが、等温のワンステップ逆転写及びリコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＴ－ＲＰＡ，Piepenburg et al., PLoS Biology 2006）を使用して確認される（図１０工程３．１）。ＲＴ－ＲＰＡは、TwistDX TwistAmp Basic RPAキットを、追加のＲＮａｓｅ阻害剤、逆転写酵素、及びオリゴｄＴプライマーと組み合わせることによりカスタマイズしてもよい。このカスタマイズされた試薬の使用によって、標的ＲＮＡからＤＮＡへのワンステップ変換が可能になり、それを次に増幅させて、摂氏３７度（体温に近い）で１０～２０分以内にシグナルを増強することができる。

【００５６】

図３工程３．１においてさらに示すように、アンプリコンは２％アガロースゲル上で分離され、エチジウムブロマイド染色により可視化されうる。陽性コントロールと比較し、ＲＴ－ＲＰＡによって、追加の精製を伴うことなく、インプットとして２μＬの低いヒト唾液を使用して標的ＲＮＡバイオマーカーが増幅された。効率的な増幅及び検出を達成するために、複数のプライマーセットを設計して標的バイオマーカーを増幅させた（図１０工程３．２）。これらのプライマーセットは、長さ及び配列において変動する。他のパラメーターを一定に保つ一方で、標的ＲＮＡを増幅するための各々のプライマーセットについての効率を、２％アガロースゲル上で可視化されたアンプリコンの強度に基づいて比較する。図１０において示す実施例において、全てのプライマーセットが標的バイオマーカーを増幅することができる一方で、プライマーセット＃３が最も高い増幅効率をもたらした。このように、プライマーセット＃３は下流の過程にさらに統合される。最後に、工程３．２からのテスト結果に基づき、最適なプライマー配列を、金ナノ粒子ベースのプローブ及びテストストリップ中に埋め込まれた標的捕捉プローブ（８）上のプローブ配列とそれぞれ相補的でありうる３’及び５’末端でのカスタマイズされたアダプター配列と連結させた（図３工程３．３）。アダプターを伴うプライマーを次に使用し、バイオマーカーＲＮＡを増幅した。

【００５７】
アダプター配列がＲＰＡ増幅後に一本鎖のままであることを確実にするために、本発明者は、プライマー配列内に三炭素鎖スペーサー（C_3）を導入し、ＤＮＡポリメラーゼがアダプター配列の相補鎖を生成するのを防止した。結果として、最終産物は、標的ｄｓＤＮＡ転写物領域を有する、増幅されたハイブリッドＤＮＡプローブを含みうる一方で、下流のハイブリダイゼーションのための一本鎖アダプター配列を維持する。
【００５８】
実施例５：側方流動アッセイスティックを使用した増幅産物の可視化。
図１１において示すように、検出アッセイの主要なユニットは膜であり、それは、増幅されたバイオマーカー及びレポーターを含む溶液が流れる基質である。１つの好ましい実施形態において、膜（１５）は、膜を通じて流れる溶液中の相補的プローブに結合することができる１つ又は複数の埋め込まれた捕捉プローブ（８）を含みうる。捕捉プローブが、それらのそれぞれの増幅されたバイオマーカー又はレポーターに結合する際、感染又は無感染を示すシグナルが出現する。このアッセイのこの広範な記載内での複数の変数は、異なる種類の結果を表すことができるように調整可能である。
【００５９】
合成ＲＴ－ＲＰＡ産物の１０倍希釈物で実行された一連のテストストリップの比色画像を図１２において示す。この実施例では、サンプルは２μＬの増幅バイオマーカー、１０μＬの金レポーターを含み、８μＬの泳動緩衝液を、テストストリップ（２）のコンジュゲートパッド（１４）に適用する。（ＲＴ－ＲＰＡ産物の濃度を、視覚的な読み取りとともに収載している。）この溶液は、毛細管作用を介して、ニトロセルロース膜を通じて吸収パッドに向かって流れる。検出限界を上回る、増幅されたバイオマーカーを伴うサンプルは、検出ゾーン中の最初の円で凝集するであろう。増幅されたバイオマーカーと相互作用しない過剰な金レポーターは、それらが初期サンプル中に存在しなかった、又はそれらの濃度が検出限界を下回っているため、ストリップを流れ落ちて、コントロールゾーンで凝集し続けるであろう（１８）。
【００６０】
（Ａ）に示すストリップの実施例において、陰性結果は右側での１つの円を示し、陽性結果は存在する２つの円を示す（弱い強度でさえ）。視覚シグナルの強度を増強するために、追加の１０μＬの金レポーター及び８μＬの泳動緩衝液を組み合わせて、コンジュゲートパッドに再び適用した。（Ｂ）は、比較のために示した（Ａ）におけるのと同じストリップのカラー画像である。（Ｃ）このアッセイは、テストストリップ上の異なる捕捉プローブ及びＲＴ－ＲＰＡ反応中の異なるアダプタープライマーを使用して多重化するように組み立てることができる。
【００６１】
実施例６：材料及び方法。
図中に一般的に示すように、一実施形態において、側方流動アッセイテストストリップ又はテストストリップは、ニトロセルロース膜で形成されうるが、それはGE Whatmanで裏打ちされたニトロセルロース膜ＦＦ１２０ＨＰ；５ｃｍ×０．４ｃｍでありうる。
ガラス繊維コンジュゲートパッドは、Millipore G041「SureWick」GFCP103000、１ｃｍ×０．４ｃｍを含みうる。セルロース吸収パッドは、Millipore C083「SureWick」セルロース繊維サンプルパッドストリップCFSP173000、１ｃｍ×０．７５ｃｍを含みうる。
【００６２】
図中に示し、上に一般的に記載するように、コンジュゲートＧＮＰプローブは、ストレプトアビジンに結合されたビオチン化オリゴ捕捉プローブを含みうるが、それは次に、ニトロセルロース膜に埋め込まれうる。１つの例において、６００μＭのオリゴ捕捉プローブを２００μＭのストレプトアビジンと室温で１時間にわたりインキュベートした。ストレプトアビジンとの複合体中の捕捉プローブをここで用いて、それらを異なる濃度に希釈し、結合条件及びシグナル強度を最適化してもよい。好ましい例において、この捕捉プロ

ーブ－ストレプトアビジン複合体を含む０．５μＬの溶液を、適切な方向でニトロセルロース膜（１５）上にピペットで移し、標的プローブをコンジュゲートパッドの最も近くに置き、コントロールプローブを吸収パッドの最も近くに置く。

【００６３】

上に記述するように、コンジュゲートされたＧＮＰプローブ又はレポーターは、塩熟成方法を介して１つ又は複数の一本鎖ＤＮＡ配列と結合させてもよい（６０ｎｍ又は１５ｎｍ又は１２．５ｎｍ直径）。泳動緩衝液を、ＲＴ－ＲＰＡ増幅溶液産物及びコンジュゲートされた金ナノ粒子と、テストストリップ上で泳動する直前に混合してもよい。

【００６４】

本明細書中で使用する用語法は、実施形態を記載するためであり、限定することを意図しない。本明細書中で使用するように、単数形「ａ」、「及び」及び「ｔｈｅ」は、内容及び文脈が明らかに他を指示しない限り、複数の指示対象を含む。このように、例えば、「バイオマーカー」への言及は、２つ又はそれ以上のそのようなバイオマーカーの組み合わせを含みうる。他に定めない限り、全ての科学的用語及び技術的用語は、それらが関係する技術において一般に使用されているのと同じ意味を有すると理解すべきである。本明細書中で使用するように、「約」又は「ほぼ」は、記載する濃度範囲の１０％以内又は記載する時間枠の１０％以内を意味する。

【００６５】

句「及び／又は」は、本明細書中で及び特許請求の範囲中で本明細書において使用するように、そのように等位接続された要素、即ち、一部の場合において接続的に存在し、他の場合において離接的に存在する要素の「いずれか又は両方」を意味すると理解すべきである。「及び／又は」で収載されている複数の要素は、同じ様式において解釈すべきであり、即ち、そのように等位接続された要素の「１つ又は複数」である。他の要素が、場合により、具体的に同定される要素に関係する又は無関係であるかにかかわらず、「及び／又は」節により具体的に同定される要素以外に存在しうる。このように、非限定的な例として、「Ａ及び／又はＢ」への言及は、無制限の言語、例えば「含む」などと組み合わせにおいて使用■■される場合、一実施形態において、Ａだけ（場合により、Ｂ以外の要素を含む）；別の実施形態において、Ｂだけ（場合により、Ａ以外の要素を含む）；さらに別の実施形態において、Ａ及びＢの両方（場合により、他の要素を含む）；等を指すことができる。

【００６６】

本発明の核酸及び／又は他の部分は、単離又は「抽出」されうる。本明細書中で使用するように、「単離された」とは、それが天然供給源に由来するか、又は全体で又は部分で合成的に作製されるかにかかわらず、通常関連付けられる成分の少なくとも一部から分離されていることを意味する。本発明の核酸及び／又は他の部分は、精製されうる。本明細書中で使用するように、「精製された」は、他の化合物又は実体の大部分から分離されていることを意味する。化合物又は部分は、部分的に精製されうる、又は実質的に精製されうる。純度は、重量測定により表示されうる、及び多様な分析技術、例えば、限定しないが、質量分析、ＨＰＬＣなどを使用して決定されうる。

【００６７】

用語「プライマー」は、本明細書中で使用するように、適した条件下でＤＮＡ合成の開始点として作用することが可能なオリゴヌクレオチドを指す。そのような条件は、核酸鎖に相補的なプライマー伸長産物の合成が、４つの異なるヌクレオシド三リン酸及び伸長のための薬剤（例えば、ＤＮＡポリメラーゼ又は逆転写酵素）の存在において、適切な緩衝液中で、及び適した温度で誘導される条件を含む。

【００６８】

プライマーは、好ましくは一本鎖ＤＮＡである。プライマーの適切な長さは、プライマーの意図される使用に依存するが、しかし、典型的には、約６～約２２５ヌクレオチドの範囲であり、中間範囲、例えば１５～３５ヌクレオチド、１８～７５ヌクレオチド、及び２５～１５０ヌクレオチドなどを含む。短いプライマー分子は、一般的に、テンプレート

と十分に安定なハイブリッド複合体を形成するために、より冷たい温度を要求する。プライマーは、テンプレート核酸の正確な配列を反映する必要はないが、しかし、テンプレートとハイブリダイズするために十分に相補的でなければならない。所与の標的配列の増幅のための適したプライマーの設計は、当技術分野において周知であり、本明細書中で引用する文献において記載されている。

【００６９】

本明細書中で使用するように、生物学的マーカー（「バイオマーカー」又は「マーカー」）は、正常な生物学的過程、病原性過程、又は治療的介入への薬理学的応答の指標として客観的に測定及び評価される特徴であり、NIH Biomarker Definitions Working Group (1998)と一致する。マーカーはまた、特定の生物学的過程を示す特徴のパターン又はアンサンブルを含むことができる。バイオマーカーの測定値は増加又は減少し、特定の生物学的事象又は過程を示しうる。また、バイオマーカーの測定値が、典型的には、特定の生物学的過程の非存在において変化する場合、一定の測定値はその過程の発生を示すことができる。好ましい実施形態において、バイオマーカーは、感染又は他の正常もしくは異常な生理学的過程を示しうる１つ又は複数のＲＮＡ転写物を含む。

【００７０】

本明細書中で言及するように、用語「核酸」、「核酸分子」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド」、及び「ヌクレオチド」は、互換的に使用されうる。これらの用語は、デオキシリボヌクレオチド（ＤＮＡ）、リボヌクレオチド（ＲＮＡ）のポリマー、及び別々のフラグメントの形態における、あるいはより大きな構築物の成分としてのそれらの修飾形態、線状もしくは分枝状、一本鎖、二本鎖、三本鎖、又はそのハイブリッドに関する。この用語はまた、ＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドを包含する。ポリヌクレオチドは、ＤＮＡ又はＲＮＡのセンス及びアンチセンスオリゴヌクレオチド配列又はポリヌクレオチド配列を含みうる。ＤＮＡ分子は、例えば、限定しないが、相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）、ゲノムＤＮＡ、合成ＤＮＡ、組換えＤＮＡ、又はそれらのハイブリッドでありうる。ＲＮＡ分子は、例えば、限定しないが、ｓｓＲＮＡ又はｄｓＲＮＡなどでありうる。この用語はさらに、天然の塩基、糖、及び共有結合的なヌクレオシド間連結で構成されるオリゴヌクレオチド、ならびにそれぞれの天然部分と同様に機能する非天然部分を有するオリゴヌクレオチドを含む。用語「核酸セグメント」及び「ヌクレオチド配列セグメント」、又はより一般的には「セグメント」は、ゲノム配列、リボソームＲＮＡ配列、転移ＲＮＡ配列、メッセンジャーＲＮＡ配列　、オペロン配列、及びコード化されている、又はペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質をコード化するように適合されうる、より小さな操作ヌクレオチド配列の両方を含む機能用語として当業者により理解されるであろう。全ての核酸プライマー、例えば配列番号４４５～４６８などは、他に記述しない限り、５’から３’のプライム方向で提示される。

【００７１】

本明細書中で使用するように、「相補的」は、逆平行ポリヌクレオチド一本鎖のヌクレオチドの間の隣接する塩基対合（それは、不対ヌクレオチドにより中断されない）により、逆平行ポリヌクレオチド鎖（又はその一部）にハイブリダイズし、それにより、相補鎖の間に二本鎖ポリヌクレオチドを形成するポリヌクレオチドの一本鎖（又はその一部）の能力を指す。第１のポリヌクレオチドは、第１のポリヌクレオチドの各々の及びすべてのヌクレオチドが、第２のポリヌクレオチドの相補的領域内のヌクレオチドと塩基対合を形成する場合、第２のポリヌクレオチド鎖に「完全に相補的」であると言う。第１のポリヌクレオチドは、第１のポリヌクレオチド中の１つのヌクレオチドが、第２のポリヌクレオチド中の対応するヌクレオチドと塩基対合しない場合、第２のポリヌクレオチドに完全には相補的ではない（即ち、部分的に相補的である）。ポリヌクレオチド鎖の間の相補性の程度は、ポリヌクレオチド鎖の間のアニーリング又はハイブリダイゼーションの効率及び強度に対する有意な効果を有する。これは、増幅反応において特に重要であり、それはポリヌクレオチド鎖の間の結合に依存する。オリゴヌクレオチドプライマーは、プライマーの少なくとも５０％（好ましくは６０％、より好ましくは７０％、８０％、さらにより好

ましくは９０％又はそれ以上）のヌクレオチドが、標的ポリヌクレオチド上のヌクレオチドと塩基対を形成する場合、標的ポリヌクレオチドに「相補的」である。

【００７２】

本明細書中で言及するように、用語「データベース」は、デジタル形式において保存されうるヌクレオチド配列情報の組織化されたコレクションに関する。一部の実施形態において、データベースは、任意の配列情報を含みうる。一部の実施形態において、データベースは、対象又は微生物のゲノム配列を含みうる。一部の実施形態において、データベースは、発現配列情報、例えば、ＥＳＴ（発現配列タグ）又はｃＤＮＡ（相補的ＤＮＡ）データベースなどを含みうる。一部の実施形態において、データベースは、非コード配列（つまり、非翻訳配列）、例えばＲＮＡファミリー（Ｒｆａｍ）のコレクションなどを含みうるが、それは、非コードＲＮＡ遺伝子、構造化シス調節エレメント、及び自己スプライシングＲＮＡに関する情報を含む。例示的な実施形態において、データベースは、冗長又は非冗長なGenBankデータベース（ＮＩＨ遺伝子配列データベース、全ての公的に利用可能なＤＮＡ配列の注釈付きコレクションである）より選択されうる。例示的なデータベースは、以下より選択されうるが、それらに限定しない：GenBank CDS（コード化配列データベース）、ＰＤＢ（タンパク質データベース）、SwissProtデータベース、ＰＩＲ（タンパク質情報源）データベース、ＰＲＦ（タンパク質配列）データベース、ＥＭＢＬヌクレオチド配列データベース、及び同様のもの、又はそれらの任意の組み合わせ。

【００７３】

本明細書中で使用するように、用語「検出」は、サンプル中の微生物の存在又は非存在の定性的決定を指す。用語「検出」はまた、微生物の「同定」、即ち、当技術分野における認められている分類法に従って、及び本明細書中に記載するように、微生物の属、種、又は株を決定することを含む。用語「検出」は、サンプル中の微生物、例えば、マイクロリットル（又はミリリットルもしくはリットル）又はマイクログラム（又はミリグラムもしくはグラムもしくはキログラム）のサンプル中の微生物のコピー数の定量化をさらに含む。用語「検出」はまた、対象又はサンプル中での感染の同定を含む。

【００７４】

本明細書中で使用するように、用語「病原体」は、生物（微生物を含む）を指し、それは、他の生物に直接的に感染することにより、又は別の生物において疾患を起こす病原物質を産生することにより（例、病原性毒素などを産生する細菌）、別の生物（例、動物及び植物）において疾患を起こす。本明細書中で使用するように、病原体は、限定しないが、細菌、原生動物、真菌、線虫、ウイロイド、及びウイルス、又はそれらの任意の組み合わせを含み、それにおいて、各々の病原体は、それ自体により、又は別の病原体と協調して、脊椎動物（限定しないが、哺乳動物を含み、及び、限定しないが、ヒトを含む）において疾患を誘発することが可能である。本明細書中で使用するように、用語「病原体」はまた、非免疫不全宿主において通常は病原性ではないであろう微生物を包含する。

【００７５】

本明細書中で使用する用語「感染」又は「感染する」は、対象の身体及び／又は対象の細胞内の微生物の存在を指す。例えば、ウイルスが対象の細胞に感染中でありうる。寄生虫（例えば、線虫など）が対象の細胞／身体に感染中でありうる。一部の実施形態において、微生物は、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、又はそれらの組み合わせを含みうる。一部の実施形態に従い、微生物は、例えば、ウイルス、例えばｄｓＤＮＡウイルス（例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルスなど）、ｓｓＤＮＡウイルス（例えば、パルボウイルスなど）、ｄｓＲＮＡウイルス（例えば、レオウイルスなど）、（＋）ｓｓＲＮＡウイルス（＋）センスＲＮＡ（例えば、ピコルナウイルス、トガウイルスなど）、（－）ｓｓＲＮＡウイルス（－）センスＲＮＡ（例えば、オルトミクソウイルス、ラブドウイルスなど）、ライフサイクル中のＤＮＡ中間体を伴うｓｓＲＮＡ－ＲＴウイルス（＋）センスＲＮＡ（例えばレトロウイルスなど）、ｄｓＤＮＡ－ＲＴウイルス（例えばヘパドナウイルスなど）などである。一部の実施形態において、微生物は、細菌、例えば、グラム陰性菌、グラム陽性菌などである。一部の実施形態において、微生物は、真

菌、例えば酵母、カビなどである。一部の実施形態において、微生物は、寄生虫、例えば、原生動物及び蠕虫などである。一部の実施形態において、微生物による感染は、対象に疾患及び／又は臨床的に検出可能な症状を与えうる。一部の実施形態において、微生物による感染は、臨床的に検出可能な症状を起こさないであろう。一部の実施形態において、微生物は共生微生物である。追加の実施形態において、微生物は古細菌、原生生物；微小植物（緑藻）、プランクトン、及びプラナリアを含みうる。一部の実施形態において、微生物は単細胞（単一細胞）である。一部の実施形態において、微生物は多細胞である。

【００７６】

本明細書中で使用するように、用語「無症候性」は、所与の病原体、又は病原体の所与の組み合わせで感染されることに特徴的な身体的症状を示さない個体を指す。

【００７７】

本発明の標的バイオマーカーは、診断及び予後の目的のために、ならびに治療、薬物スクリーニング、及び患者の層別化の目的（例、評価のために患者を多数の「サブセット」中にグループ化する）、ならびに本明細書中に記載する他の目的のために使用してもよい。

【００７８】

本発明の一部の実施形態は、患者からのサンプル中で、バイオマーカーのレベルを検出することを含み、バイオマーカーの存在又は発現レベルは、１つ又は複数の病原体による感染又は感染の可能性を示している。本明細書中で使用するように、用語「生物学的サンプル」又は「サンプル」は、任意の体液又は組織からのサンプルを含む。本明細書中で提供する方法に従った使用のために適切な生物学的サンプル又はサンプルは、血液、血清、尿、唾液、組織、細胞、及び器官、あるいはそれらの一部を含むが、それらに限定しない。「対象」は、目的の任意の生物、一般的には哺乳動物の対象、好ましくはヒトの対象である。

【００７９】

任意の等温増幅プロトコールを、本明細書中で提供する方法に従って使用することができる。等温増幅の例示的な種類は、核酸配列ベースの増幅（ＮＡＳＢＡ）、ループ媒介等温増幅（ＬＡＭＰ）、鎖置換増幅（ＳＤＡ）、ヘリカーゼ依存性増幅（ＨＤＡ）、ニッキング酵素増幅反応（ＮＥＡＲ）、ＲＮＡ技術のシグナル媒介増幅（ＳＭＡＲＴ）、ローリングサークル増幅（ＲＣＡ）、等温多重置換増幅（ＥＶＩＤＡ）、シングルプライマー等温増幅（ＳＰＩＡ）、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）、及びポリメラーゼスパイラル反応（ＰＳＲ、ワールドワイドウェブ上のｎａｔｕｒｅ．ｃｏｍ／ａｒｔｉｃｌｅｓ／ｓｒｅｐｌ２７２３で利用可能である）を含むが、それらに限定しない。一部の場合では、フォワードプライマーを使用し、結果として得られたＤＮＡテンプレート中にＴ７プロモーター部位を導入し、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼを介して増幅ＲＮＡ産物の転写を可能にする。他の場合では、逆プライマーを使用し、トーホールド配列ドメインのトリガー配列を加える。

【００８０】

本明細書中で使用するように、用語「増幅」は、増幅反応において産生された、特定のポリヌクレオチドのコピーであるポリヌクレオチドを指す。増幅産物は、本発明に従い、ＤＮＡ又はＲＮＡでありうるが、それは二本鎖又は一本鎖でありうる。増幅産物はまた、本明細書中で「アンプリコン」として言及される。本明細書中で使用するように、用語「アンプリコン」は、核酸増幅反応からの増幅産物を指す。この用語は一般的に、所与の増幅プライマーのセットを使用して生成された、公知のサイズの予想される特定の増幅産物を指す。

【表１】

表１．ゴールドスタンダードテストと本発明の側方流動スティックとの比較。

診断テストタイプ	感度	特異性	曝露後の検出までの平均時間	未知の病原体を検出できるか？	検査室？	訓練された人員？	費用
血清学ベース	高	中程度	遅い	いいえ	はい―大半の場合	はい―大半の場合	$$
培養	中程度	中程度	遅い	臨床的に疑われる＆培養できる場合だけ。	はい	はい	$$
PCR	高	高	中程度	いいえ	はい	はい	$$$
本発明者らの産物	高*	中程度*	最も早期	はい	いいえ	いいえ	$

【表２】

表２：ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＣＯＶＩＤ－１９）の検出用に使用されるプライマー。

名称	記載	オリゴヌクレオチド配列(5'->3')	標識	濃度	配列番号
2019-nCoV_N1-F	2019-nCoV_N1 フォワードプライマー	5'-GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT-3'	なし	20μM	469
2019-nCoV_N1-R	2019-nCoV_N1 リバースプライマー	5'-TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG-3'	なし	20μM	470
2019-nCoV_N1-P	2019-nCoV_N1 Probe	5'-FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG ACC-BHQ1-3'	FAM, BHQ-1	5μM	471
2019-nCoV_N2-F	2019-nCoV_N2 フォワードプライマー	5'-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA-3'	なし	20μM	472
2019-nCoV_N2-R	2019-nCoV_N2 リバースプライマー	5'-GCG CGA CAT TCC GAA GAA-3'	なし	20μM	473
2019-nCoV_N2-P	2019-nCoV_N2 プローブ	5'-FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-BHQ1-3'	FAM, BHQ-1	5μM	474
2019-nCoV_N3-F	2019-nCoV_N3 フォワードプライマー	5'-GGG AGC CTT GAA TAC ACC AAA A-3'	None	20μM	475
2019-nCoV_N3-R	2019-nCoV_N3 リバースプライマー	5'-TGT AGC ACG ATT GCA TTG-3'	なし	20μM	476
2019-nCoV_N3-P	2019-nCoV_N3 プローブ	5'-FAM-AYC ACA TTG GCA CCC GCA ATC CTG-BHQ1-3'	FAM, BHQ-1	5μM	477
RP-F	RNAse P フォワードプライマー	5'-AGA TTT GGA CCT GCG AGC G-3'	なし	20μM	478
RP-R	RNAse P リバースプライマー	5'-GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT-3'	なし	20μM	479
RP-P	RNAse P プローブ	5'-FAM -TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG -BHQ-1-3'	FAM, BHQ-1	5μM	480

【図面】

【図１Ａ】

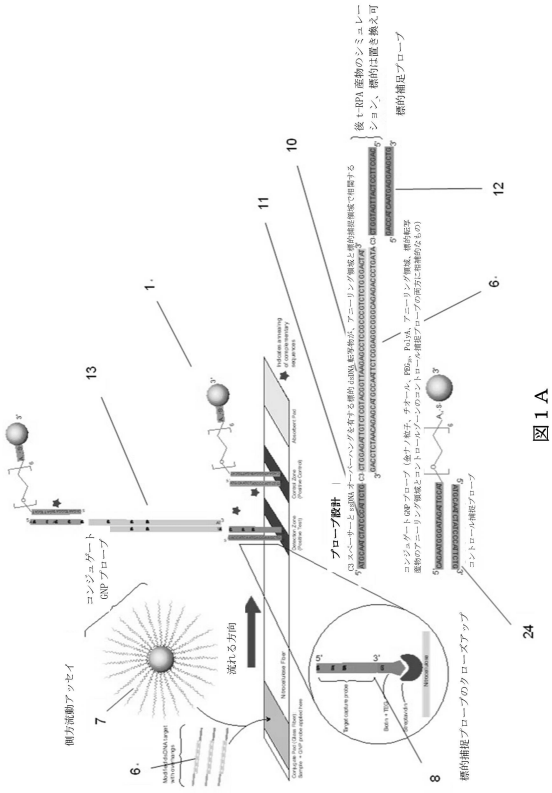


図１Ａ

【図１Ｂ】

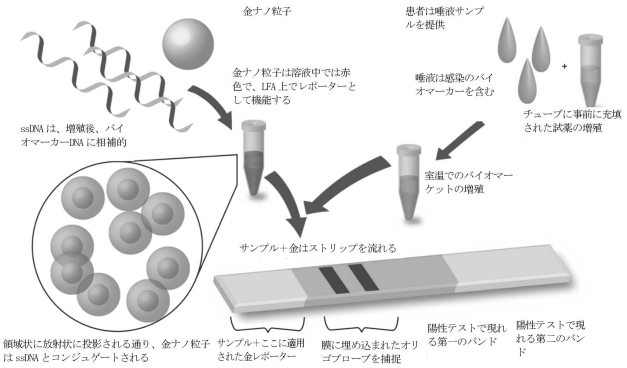


図１Ｂ

【図２】

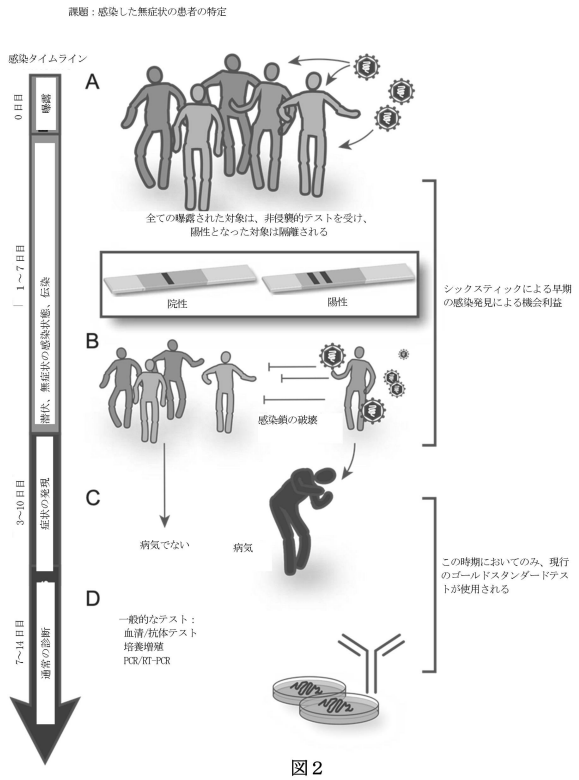


図２

【図３Ａ】

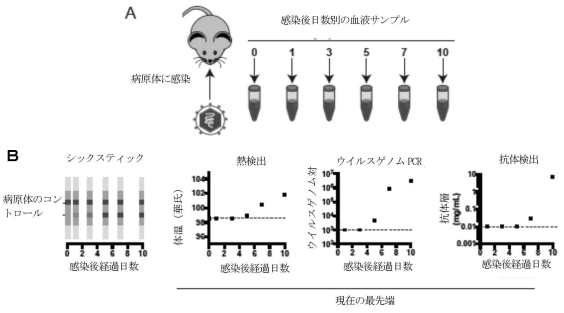


図３Ａ

【図３Ｂ】

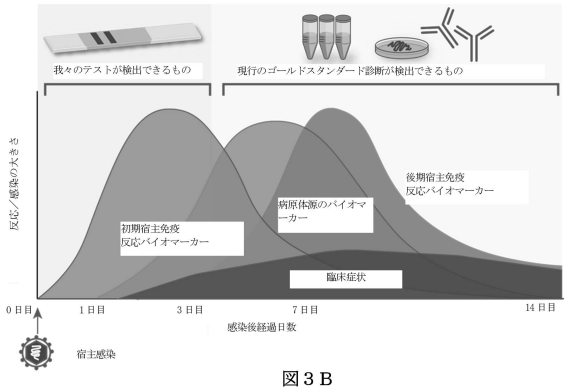


図３Ｂ

【図４】

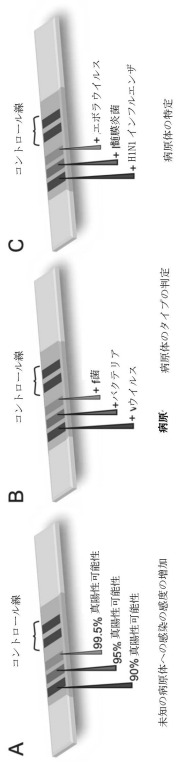


図４

【図５】

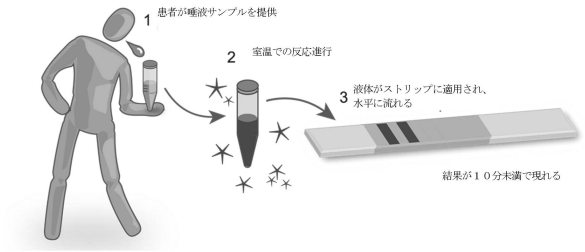


図５

【図６】

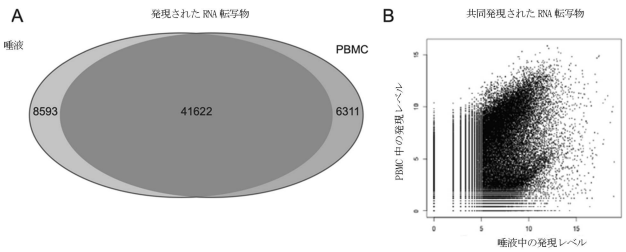


図６

【図７】



図７

【図８】

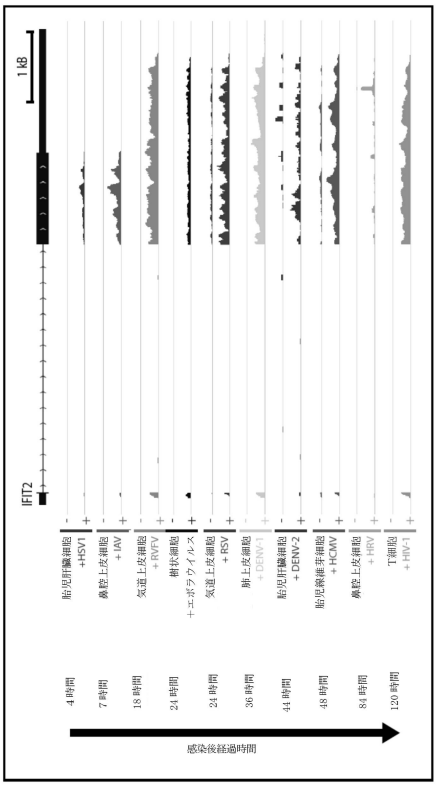


図８

【図９】

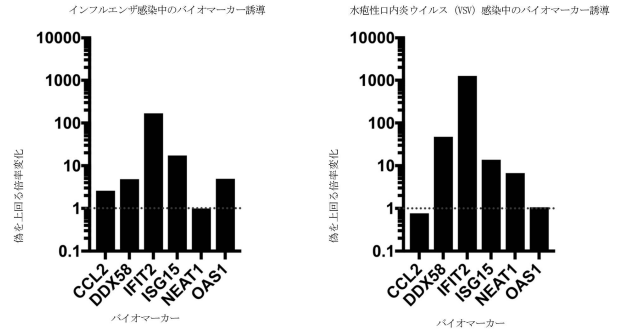


図９

【図１０】

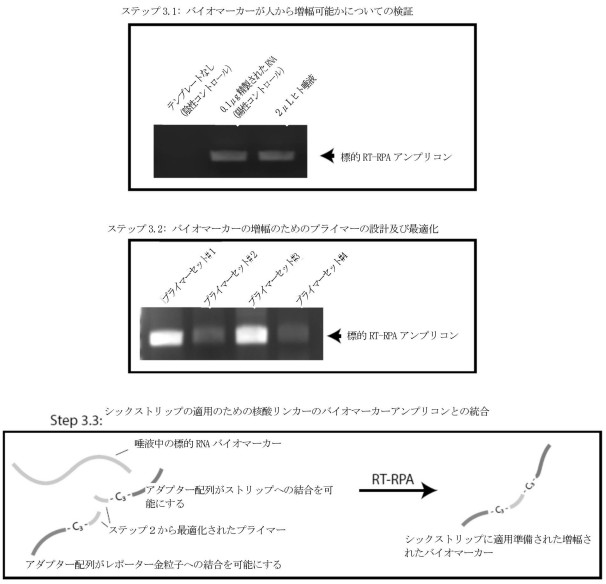


図１０

【図１１】

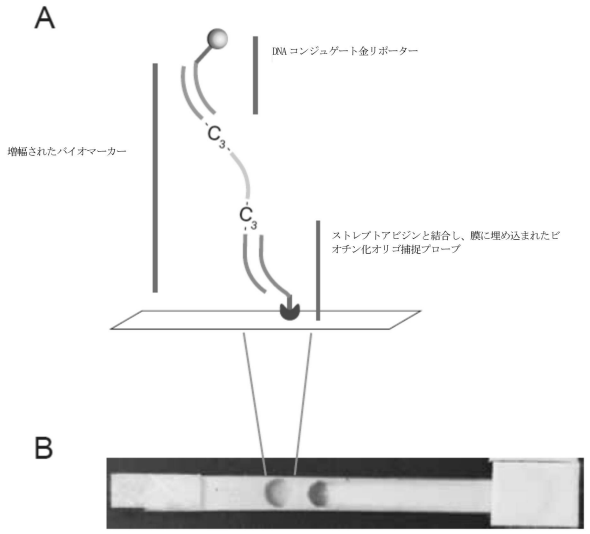


図１１

【図１２】

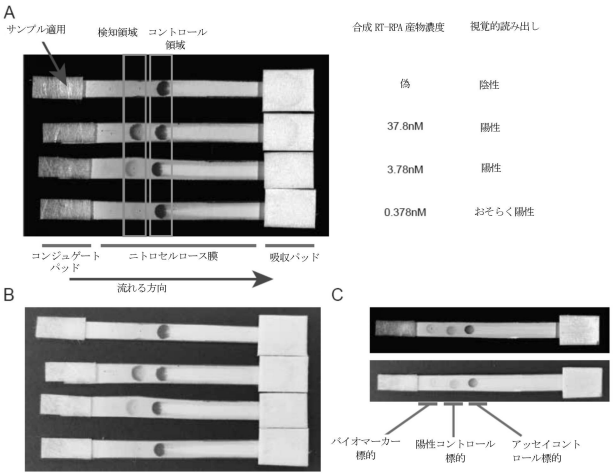


図１２

【図１３Ａ】

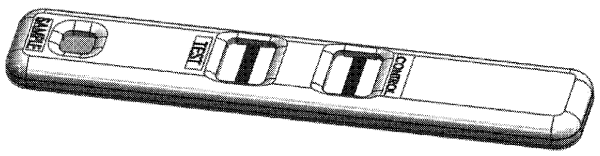


FIGURE 13A

【図１３Ｂ】

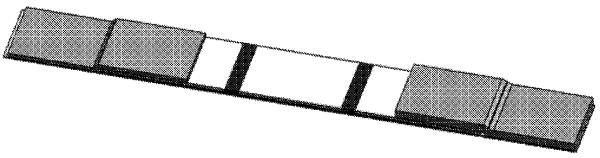


FIGURE 13B

【図１３Ｃ】

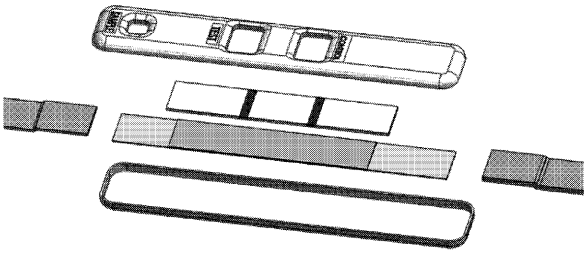


FIGURE 13C

【図１３Ｄ】

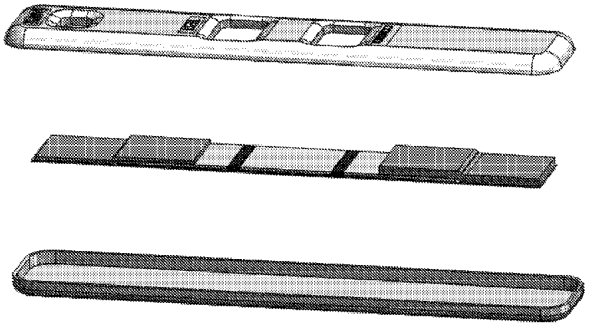


FIGURE 13D

【図１４】

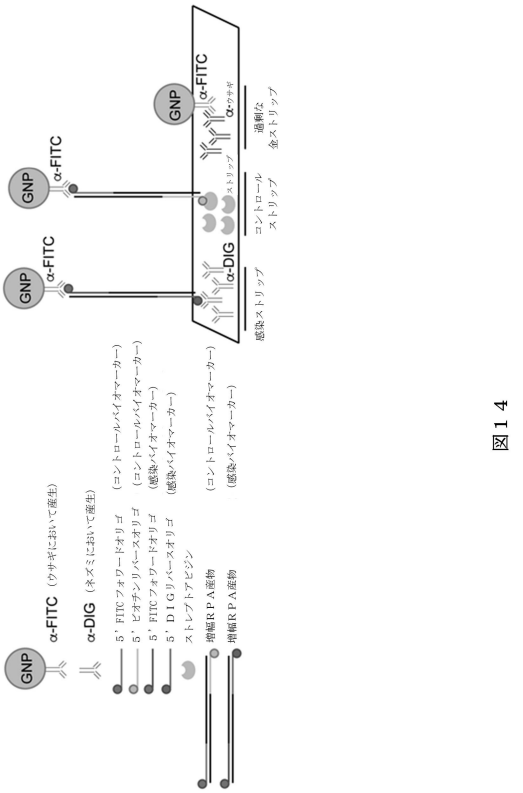


図１４

【図１５】

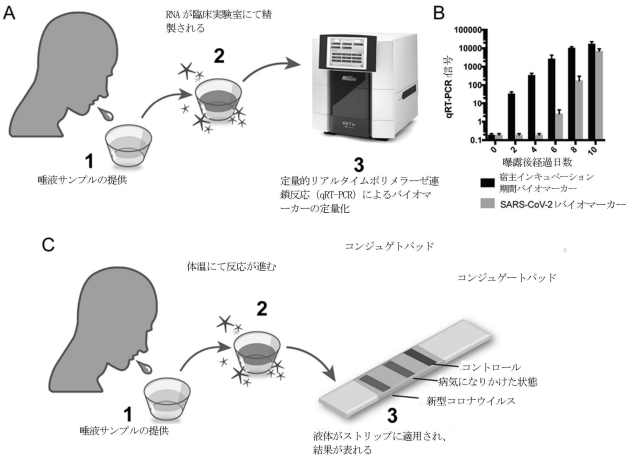


図１５

【図１６】

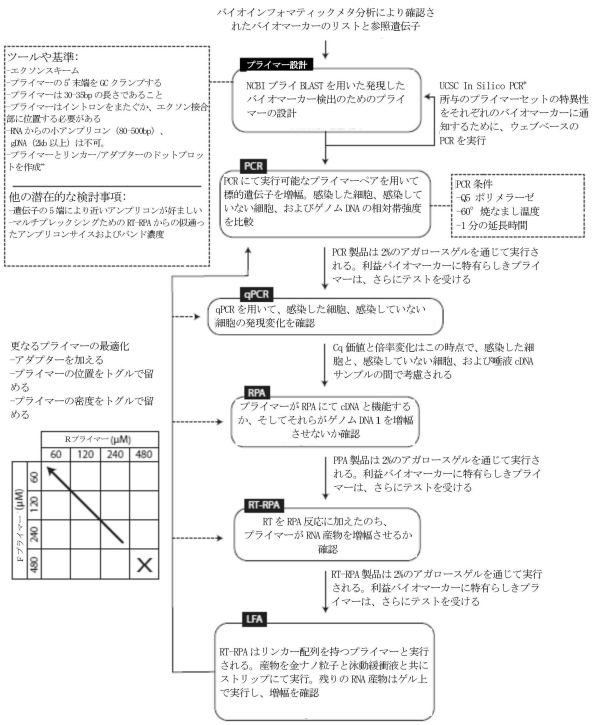


図１６

【図１７】

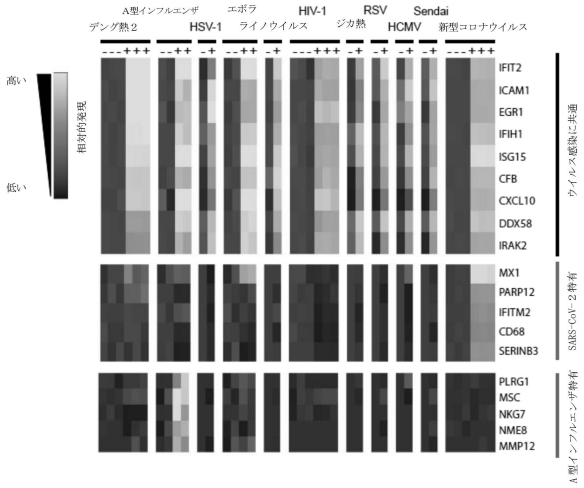


図１７

【図１８】

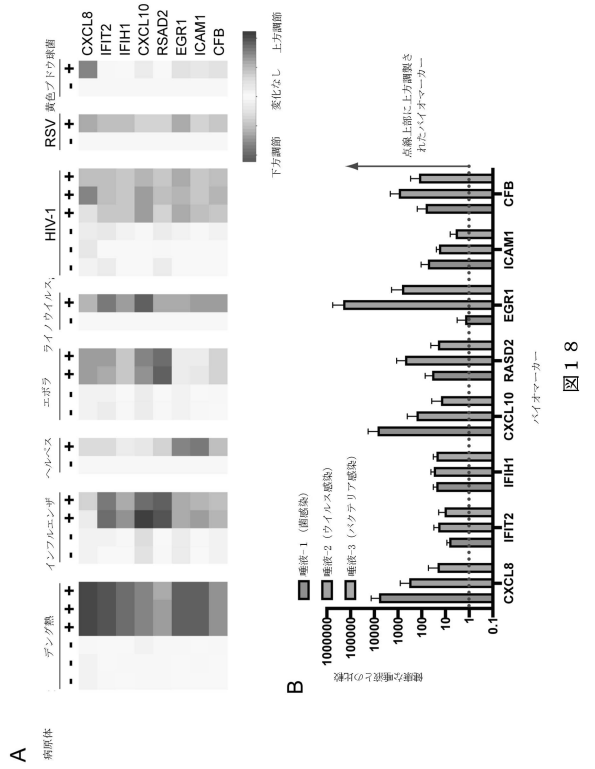
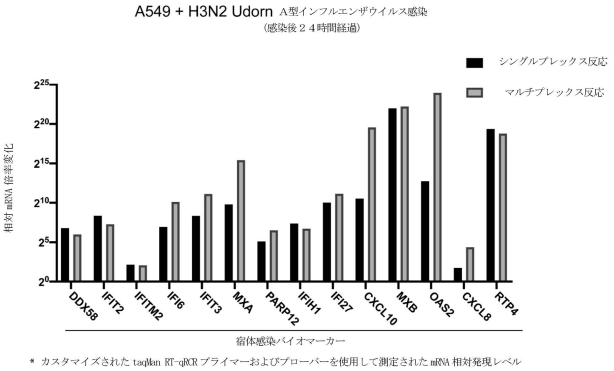


図１８

【図１９】



＊ カスタマイズされた taqMan RT-qPCR プライマーおよびプローバーを使用して測定された miRNA 相対発現レベル

図１９

【図２０】

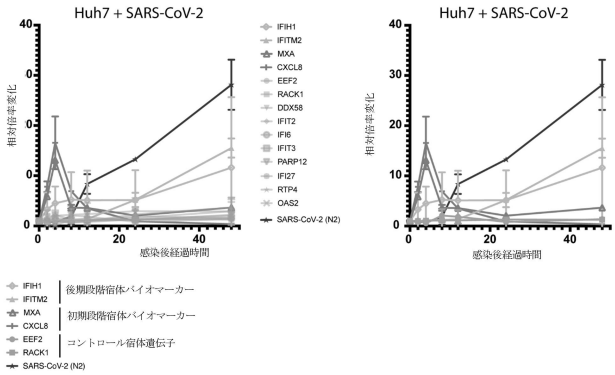


図２０

【図２１】

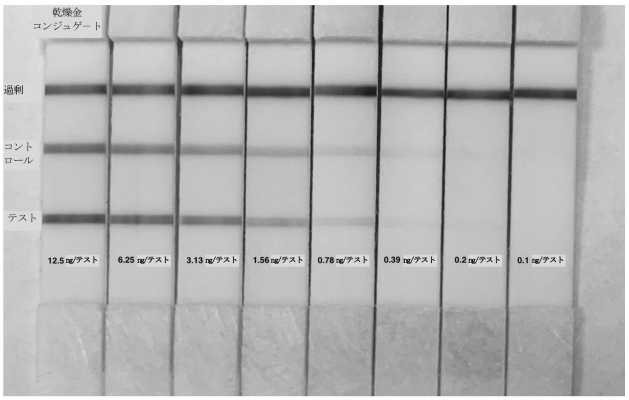


図２１

【図２２】

プライマーペア	フォワードプライマー 配列（5'→3'）	配列番号	リバースプライマー 配列（5'→3'）	配列番号	テンプレート	プライマー効率及びスロープ（a）	(1:10) Cq	融解曲線	log[Cp]-インフルエンザ (SWAN)	log[Cp]-インフルエンザ (CALU)
CALR (1F+1R)	GAGTATTCTCCCGATC CCAGTATCTATGCC	481	ATTTGTTTCTCTGCT GCCTTTGTTACGCCC	516	A549 +flu	3.567	20.1	OK	na	na
NCL (2F+2R)	AGGAAAAGACAGTAAG AAAGAGCGAGATGC	482	TACCCTTTAGATTTG CCATTTTGGTTCTGG	517	A549 +flu	4.073	18.7	OK	na	na
RACK1 (2F+1R)	TCCCACTTTGTTAGTG ATGTGGTTATCTCC	483	CAAATCGCCTCGTGG TGGTGCCCGTTGTGA G	518	A549 +flu	3.219	18	OK	na	na
IFITM2 (For1/Rev1)	ATAGCATTCGCGTACT CCGT	484	TGATGCCTCCTGATC TATCGC	519	A549+flu	3.479	20	OK	6.011	6.747
IFI27 (For1/Rev1)	GCCACGGAATTAACCC GAGC	485	GCCACAACTCCTCCA ATCACA	520	A549+flu	3.377	22.1	OK	959.888	1077.512
CD68 (For1/Rev1)	GCAGCACAGTGGACAT ICTCG	486	GGTCACTGGGGCAGG AGAAA	521	A549+flu	3.538	22.8	OK	6.131	6.883
OAS3 (For1/Rev1)	AAATGGGAGAATCCCC GCGT	487	CCGCATTGCTGTAGC TGTGG	522	A549+flu	3.415	22.3	OK	3.936	4.632
OAS1 (For2/Rev2)	GGGTGGTGGAGACCCA AAGG	488	TCGGTCTCATCGTCT GCACTG	523	A549+flu	3.453	23.3	OK	16.423	21.422
C3 (1F+1R)	CAAAGATCAACTCACC TGTAATAAATTCGACC	489	TTGTATGAAGCAATT CTCCTCAGCACAGCG GC	524	A549+flu	3.354	20.8	OK	0.475	1.388
IFIT3 (For2/Rev2)	ACAGCAGAGACACAGA GGGCA	490	AGCTGTGGAAGGATT TTCTCCAGG	525	A549+flu	3.38	21.9	OK	227.935	268.26
DDX60 (For1/Rev1)	GACACCCACCGGTCCTG AGTC	491	GCCTCCAACCTGAAC TGGCA	526	A549+flu	3.084	25.1	OK	11.962	14.078
CFB (1F+1R)	ATTTGTCTCCCCTGCA CCGA	492	GCCAGAATCACCTCT GCAAGTAT	527	A549+flu	3.344	23.5	OK	4.511	5.785
IFIH1 (For2/Rev2)	ACAGCTTCACCTGGTG ITGGA	493	ATGGCAAACTTCTTG CATGGCT	528	A549+flu	3.258	22.1	OK	73.156	86.098
ZFP36 (1F+1R)	GGATCTGACTGCCATC TACGAGAGCCTCCTG	494	CAGTGGGCGAAGTGG GTGAGGGTGACAGCT C	529	A549+flu	3.619	21.2	OK	0.597	1.743
DDX58 (For1/Rev1)	CCGGAAGACCCTGGAC CCTA	495	AGGGCATCCAAAAAG CCACG	530	A549+flu	3.418	21.8	OK	63.895	75.199
NFKBIA (2F+2R)	CAACAGAGTTACCTAC CAGGGCTATTCTCC	496	CCAAACACACAGTCA TCATAGGGCAGCTCG T	531	A549 + IFN	3.845	20.1	OK	1.038	3.032
TNFAIP (For1/Rev1)	TGTGAGCAGCCCCTAA CAGG	497	CTCTGTGGTACACAC CGGCT	532	A549+flu	2.974	27.7	OK	0.617	0.726
IFIT2 (For1/Rev1)	CCCTGCCGAACAGCTG AGAA	498	AGTTGCCGTAGGCTG CTCTC	533	A549+flu	3.314	19.7	OK	1871.222	2202.26
ICAM1 (1F+1R)	ACCATCTACAGCTTTC CGGC	499	ACCATCTACAGCTTT CCGGC	534	A549 + IFN	3.299	24.3	OK	4.356	6.245
CXCL8 (2F+2R)	CCAGGAAGAAACCACC GGAA	500	CTTGGCAAAACTGCA CCTTCAC	535	A549 + IFN	3.64	26.2	OK	13.09	38.228
IRAK2 (1F+1R)	GTGGAATAGTGTTGGC CGAGGT	501	GCGGTGCTGCTTGGA ATATC	536	A549 + IFN	3.392	24.8	OK	0.804	1.054
BIRC3 (2F+2R)	AGTGCGGGTTTTTATT ATGTGGGTAACAGTG	502	TTTTCATCTCCTGGG CTGTCTGATGTGGAT AG	537	A549 + IFN	3.041	20.7	OK	0.675	1.97
CXCL10 (For2/Rev2)	TGCAAGCCAATTTTGT CCACG	503	GCCTCTGTGTGGTCC ATCCT	538	A549+flu	3.311	25.6	OK	1907.262	2244.676
OAS2 (For2/Rev2)	TGAGCCAGTTGCAGAA AACCA	504	GTGTCTGCATTGTCG GCACTT	539	A549+flu	3.039	25.9	OK	1489.376	1752.861
OAS2 (For5/Rev5)	CGTTGGTGTTGGCACT TTCG	505	TGCATTGTCGGCACT TTCC	540	A549+flu	3.269	26.1	OK	415090.8	465955.8
RTP4 (For2/Rev2)	AACCTTCAGCTAGACT GCCTGG	506	GCACAGAATCTGCAC ITGGGC	541	A549+flu	2.959	28.2	OK	2201.367	2471.122
RTP4 (For4/Rev4)	TGGACGCTGAAGTTGG ATGGC	507	CAACTTCGCTGGCAG GAGGAA	542	A549+flu	3.466	28.3	OK	2162.919	2427.962
CMPK2 (For2/Rev2)	AGCCCAACAGTGTGTT TCGTC	508	GGACCTTTTCTCTGG AGGGGC	543	A549+flu	3.311	23.1	OK	231.755	302.295
GBP1 (For2/Rev2)	GTGCTAGAAGCCAGTG CTCGT	509	TGGGCCTGTCATGTG GATCTC	544	A549+flu	3.337	25.8	OK	67.725	88.339
IFI44 (For1/Rev1)	GGCCTGTGCAGGGATG ACATA	510	TCCTTCAGCGATGGG GAATCAA	545	A549+flu	3.502	25.1	OK	1173.109	1380.644
IFI44L (For2/Rev2)	TCTGTCTCCAAACCGT GGCT	511	AGCAGCTTGCGCAGA TGATTT	546	A549+flu	3.016	27.6	OK	1093557.067	1287018.571
ISG15 (For2/Rev2)	ATGCAGCGAACCTCTG AGCA	512	GGTCAGCCAGAACAG GTCGT	547	A549+flu	3.337	22.7	OK	254.193	331.563
ISG15 (For4/Rev4)	AGGCAGCGAACTCATC TTIGC	513	ACGCCGATCTTCTGG GTGA	548	A549+flu	3.396	22.3	OK	335.316	376.406
MxB (For3/Rev3)	CATGATTGTGAAGTGC CGGG	514	CAACGGGAGCGATTT TTGGA	549	A549+flu	3.135	25.7	OK	1177.107	1321.349
SERPING1 (For5/Rev5)	ACCAGAAGTTTGGAGT CCG	515	GCATTTGGATTTGAG GAGGCT	550	A549+flu	3.312	29.7	OK	5.588	6.273

図２２

【図２３】

表示上の都合	プライマー指定	配列番号	プライマー配列（5'→3'）	配列番号	タックマンプローブ 指定	タックマンプローブ配列（5'→3'）	配列番号	(1:10) Cq 値（プライマー効率算出用）	多重化グループ	タックマン 消光剤	タックマン 5'色素	
												コントロール バイオマーカー
CALR	WTF_CALR_1F	551	GAGTATTCTCCCGATCCCAGTATCTATGCC	586	QY_CALR_TM1	ATGAGGCATACGCTGAGGAGTTTGG	587	20.1	1	QSY	ABY	
	WTF_CALR_1R	552	ATTTGTTTCTCTGCTGCCTTTGTTACGCCC									
RACK1	WTF_RACK1_1F	553	TCCCACTTTGTTAGTGATGTGGTTATCTCC	587	QY_RACK1_TM1	CAGTTTGCCCTCTCAGGCTCGT	588	18.0	1	MGBNFQ	VIC	
	WTF_RACK1_1R	554	CAAATCGCCTCGTGGTGGTGCCCGTTGTGAG									
EEF2	TM_EEF2_1F	555	ATCGAGAGCGTCGGGAGCATATCATCGCGG	589	TM_EEF2_1P	ACGGTCAGTGAAGAGTTCG	590	18.7	1	MGBNFQ	6FAM	
	TM_EEF2_1R	556	ACCGTCGATGTCGTCGAGAGTTTGG									
DDX58	TM_DDX58_1F	557	AGGCATCCAAAAAGCCACG	591	TM_DDX58_1P	TTAGGGAGAAGAAGTGGTGCAG	592	21.8	2	QSY	ABY	ハイブリ
	TM_DDX58_1R	558	AGCCGTATCCAAAAAGCCACG									
IFIT2	IFIT2_For1	559	ACCTGCCGAAACAGTTGAGAA	592	QY_IFIT2_TM1	CTGCAACCATCAGTTGAGAAC	593	19.7	2	MGBNFQ	6FAM	
	IFIT2_Rev1	560	ATTGCCGAAACAGTTGAGAAC									
IFITM2	TM_IFITM2_1F	561	ATGAGCATTCGCGTACTCCGT	593	TM_IFITM2_1P	TGGCTCCACCGCCAAGTGC	594	20.0	2	MGBNFQ	VIC	
	TM_IFITM2_1R	562	TGGTGCCCTCGTCGATCTATCGC									
MXA	MXA_For5	563	ATCCAGAGATCGCAGACTTG	594	QY_MXA_TM1	TACACACCGTTGCAGCGAATATG	595	21.6	3	MGBNFQ	VIC	
	MXA_Rev5	564	TCCTCTCTCTCCCATCTATC									
IFI6	TM_IFI6_1F	565	TCCTCACTGCTCCAGCCAC	595	TM_IFI6_1P	CTGCTGCTTCTTCACTTGC	596	18.9	3	QSY	ABY	ハイブリ
	TM_IFI6_1R	566	TCCTCACTGCTCCAGCCAC									
IFIT3	TM_IFIT3_1F	567	AGCTGTGGAAGGATTTTCTCCAGG	596	TM_IFIT3_1P	TCATGAGTGAAGGTTCACCAAG	597	21.9	3	MGBNFQ	6FAM	
	TM_IFIT3_1R	568	AGCTGTGGAAGGATTTTCTCCAGG									
IFI27	IFI27_For1	569	GCCACAACTCCTCCAATCACA	597	QY_IFI27_TM1	CATCAGCAGTTGAGCAGTGTG	598	22.1	4	MGBNFQ	6FAM	ハイブリ
	IFI27_Rev1	570	GCCACAACTCCTCCAATCACA									
IFIH1	TM_IFIH1_1F	571	ATGGCAAACTTCTTGCATGGCT	598	TM_IFIH1_1P	CGAAGCAAGCCAAAGCTGAAG	599	22.1	4	MGBNFQ	VIC	
	TM_IFIH1_1R	572	ATGGCAAACTTCTTGCATGGCT									
PARP12	TM_PARP12_1F	573	ACCATCGAAAATCTCGAATACC	599	TM_PARP12_1P	TCCAAGCCGCGAAGAGCATC	600	23.7	4	QSY	ABY	
	TM_PARP12_1R	574	GCTCCTCGAAACCGACTCTTC									
IRF9	TM_IRF9_1F	575	CTCCAGCCATACTCCACAAGATG	600	TM_IRF9_1P	CTCCAGCCATACTCCACAAGATG	601	23.9	5	MGBNFQ	6FAM	ハイブリ
	TM_IRF9_1R	576	TCCAAGCCATACTCCACAAGATG									
CXCL10	CXCL10_For2	577	TGCAAGCCAATTTTGTCCACG	601	TM_CXCL10_TM1	AGCAGTTAGCAAGGAAAGGTC	602	25.6	5	MGBNFQ	VIC	
	CXCL10_Rev2	578	CATGATTGTGAAGTGCCGGG									
MxB	TM_MxB_1F	579	CAACGGGAGCGATTTTTGGA	602	TM_OAS2_1P	CCAGTCCCGCATCCTTTGAAGCAG	603	26.1	6	MGBNFQ	VIC	
	TM_MxB_1R	580	CAACGGGAGCGATTTTTGGA									
OAS2	TM_OAS2_1F	581	CCTGTGTTGGCACTTTCGTG	603	TM_CXCL8_1P	TGGCCGTTGGCTGTCTGTTG	604	26.2	6	MGBNFQ	6FAM	ハイブリ
	TM_OAS2_1R	582	CCTGTGTTGGCACTTTCGTG									
CXCL8	TM_CXCL8_1F	583	CTGGCCGTTGGCTGTCTGTTG	604	TM_RTP4_1P	CTCTCTGTTTGGTATTGGTTCTTC	605	28.3	8	QSY	ABY	
	TM_CXCL8_1R	584	CTGGCCGTTGGCTGTCTGTTG									
RTP4	TM_RTP4_1F	585	CTCTCTGTTTGGTATTGGTTCTTC									
	TM_RTP4_1R	586	CTCTCTGTTTGGTATTGGTTCTTC									

図２３

【図２４】

A

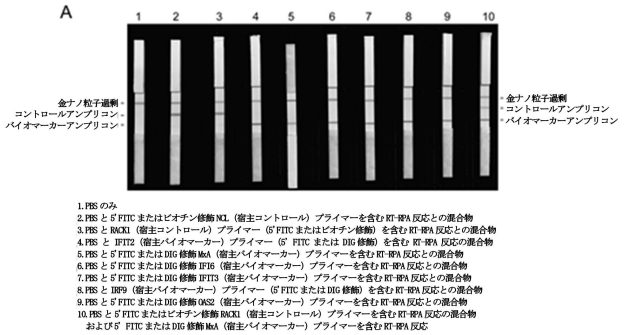
バイオマーカー	フォワードプライマー	配列番号	配列番号（5’→3’）	リバースプライマー	配列番号	配列番号（5’→3’）
CALR	WTF_CALR_1F	605	GAGTATTCTCCCGATCCCAGTATCTATGCC	WTF_CALR_1R	623	ATTTGTTTCTCTGCTGCCTTTGTTACGCCC
RACK1	WTF_RACK1_2F	606	TCCCACTTTGTTAGTGATGTGGTTATCTCC	WTF_RACK1_1R	624	CAAATCGCCTCGTGGTGGTGCCGTTGTGAG
EEF2	WTF_EEF2_1F	607	ATCGAGGAGTCGGGAGAGCATATCATCGCGG	WTF_EEF2_1R	625	ACCCTTGGTGATGTCGGTGAGGATGTTGGG
DDX58	RPA_DDX58_1F	608	CAGGATTATATCCGGAAGACCCTGGACCCTA	RPA_DDX58_1R	626	TGCATGGTCTAGGGCATCCAAAAGCCACG
IFIT2	RPA_IFIT2_1F	609	TGAACCGAGCCCTGCCGAACAGCTGAGAA	RPA_IFIT2_1R	627	ATGGCATTTTAGTTGCCGTAGGCTGCTCTC
IFITM2	RPA_IFITM2_1F	610	CCTGGGCTTCATAGCATTCGCGTACTCCCGT	RPA_IFITM2_1R	628	TGGCCTCAATGATGCCTCCTGATCTATCGC
MxA	RPA_MxA_1F	611	AGTATCGTGGTAGAGAGCTGCCAGGCTTTG	RPA_MxA_1R	629	TTATCGAAACATCTGTGAAAGCAAGCCGGA
IFI6	RPA_IFI6_1F	612	ACCGTTACTCGCTGCTGTGCCCATCTATC	RPA_IFI6_1R	630	AGCACTTTTCTTACCTGCCTCCACCCCAC
IFIT3	RPA_IFIT3_1F	613	CTTTTCGGAACAGCAGAGACACAGAGGGCA	RPA_IFIT3_1R	631	GGCATTTCAGCTGTGGAAGGATTTTCTCCAGG
IFI27	RPA_IFI27_1F	614	TACTCTCTAGGCCACGGAATTAACCGAGC	RPA_IFI27_1R	632	ATGGGCACAGCCACAACTCCTCCAATCACA
IFIH1	RPA_IFIH1_1F	615	CTGGGACTAACAGCTTCACCTGGTGTTGGA	RPA_IFIH1_1R	633	GCATCTGCAATGGCAAACTTCTTGCATGGCT
PARP12	RPA_PARP12_1F	616	GATGTGACGACCATGCAAACCTGCAATACC	RPA_PARP12_1R	634	CAAAGTAGAAAGGCAGCGTGCGGTTAAAGAG
IRF9	RPA_IRF9_1F	617	TGCGTGGAGCTCTTCAGAACCGCCTACTTC	RPA_IRF9_1R	635	TGGAGTCTGCTCCAGCAAGTATCGGGCAA
CXCL10	RPA_CXCL10_1F	618	AATTATTCCTGCAAGCCAATTTTGTCCACG	RPA_CXCL10_1R	636	ATGGGAGAGGCAGCCTCTGTGTGGTCCATCCT
MxB	RPA_MxB_1F	619	AGAAGGGCTACATGATTGTGAAGTGCCGGG	RPA_MxB_1R	637	GTCCTTCTAACAACGGAGCGATTTTTGGA
OAS2	RPA_OAS2_1F	620	TGGAGGGGACCGTTGGTGTTGGCATCTTCTG	RPA_OAS2_1R	638	TTCCTGGTGTCTGCATTGTCGGCACTTTCC
CXCL8	RPA_CXCL8_1F	621	AGGACAAGAGCCAGGAAGAAACCACCGGAA	RPA_CXCL8_1R	639	TAGCACTCCTTGGCAAAACTGCACCTTCAC
RTP4	RPA_RTP4_1F	622	CGGGCCACATGGACGCTGAAGTTGGATGGC	RPA_RTP4_1R	640	GCGGAAGCCCAACTTCGCTGGCAGGAGGAA

B

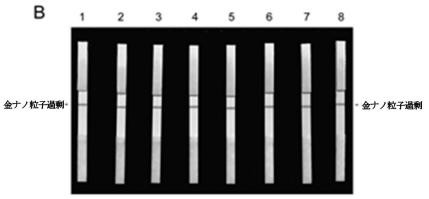
バイオマーカー	アッセイ適合性のための５’修飾ＲＴ-ＲＰＡプライマー	配列番号
IFI6_1F_FITC	/5FluorT/ACCGTTTACTCGCTGCTGTGCCCATCTATC	641
IFI6_1R_DIG	/5DigN/AGCACTTTTTCTTACCTGCCTCCACCCCAC	642
IRF9_1F_FITC	/5FluorT/TGCGTGGAGCTCTTCAGAACCGCCTACTTC	643
IRF9_1R_DIG	/5DigN/TGGAGTCTGCTCCAGCAAGTATCGGGCAA	644
IFIT2_1F_FITC	/5FluorT/TGAACCGAGCCCTGCCGAACAGCTGAGAA	645
IFIT2_1R_DIG	/5DigN/ATGGCATTTTAGTTGCCGTAGGCTGCTCTC	646
CXCL8_1F_FITC	/5FluorT/AGGACAAGAGCCAGGAAGAAACCACCGGAA	647
CXCL8_1R_DIG	/5DigN/TAGCACTCCTTGGCAAAACTGCACCTTCAC	648
MxA_1F_FITC	/5FluorT/AGTATCGTGGTAGAGAGCTGCCAGGCTTTG	649
MxA_1R_DIG	/5DigN/TTATCGAAACATCTGTGAAAGCAAGCCGGA	650
OAS2_1F_FITC	/5FluorT/TGGAGGGGACCGTTGGTGTTGGCATCTTCTG	651
OAS2_1R_DIG	/5DigN/TTCCTGGTGTCTGCATTGTCGGCACTTTCC	652
IFIT3_1F_FITC	/5FluorT/CTTTTCGGAACAGCAGAGACACAGAGGGCA	653
IFIT3_1R_DIG	/5DigN/GGCATTTCAGCTGTGGAAGGATTTTCTCCAGG	654
RACK1_2F_FITC	/5FluorT/TCCCACTTTGTTAGTGATGTGGTTATCTCC	655
RACK1_1R_Biot	/5BiodT/CAAATCGCCTCGTGGTGGTGCCCGTTGTGAG	656

図２４

【図２５】



1. PBS のみ
2. PBS と 5’FITC またはビオチン修飾 NCL（宿主コントロール）プライマーを含む RT-RPA 反応との混合物
3. PBS と RACK1（宿主コントロール）プライマー（5’FITC またはビオチン修飾）を含む RT-RPA 反応との混合物
4. PBS と IFIT2（宿主バイオマーカー）プライマー（5’ FITC または DIG 修飾）を含む RT-RPA 反応の混合物
5. PBS と 5’FITC または DIG 修飾 MxA（宿主バイオマーカー）プライマーを含む RT-RPA 反応との混合物
6. PBS と 5’FITC または DIG 修飾 IFI6（宿主バイオマーカー）プライマーを含む RT-RPA 反応との混合物
7. PBS と 5’FITC または DIG 修飾 IFIT3（宿主バイオマーカー）プライマーを含む RT-RPA 反応との混合物
8. PBS と IRF9（宿主バイオマーカー）プライマー（5’FITC または DIG 修飾）を含む RT-RPA 反応との混合物
9. PBS と 5’FITC または DIG 修飾 OAS2（宿主バイオマーカー）プライマーを含む RT-RPA 反応との混合物
10. PBS と 5’FITC またはビオチン修飾 RACK1（宿主コントロール）プライマーを含む RT-RPA 反応の混合物
および 5’ FITC または DIG 修飾 MxA（宿主バイオマーカー）プライマーを含む RT-RPA 反応



1. PBS と 5’FITC またはビオチン修飾 NCL（宿主コントロール）プライマーの混合物
2. PBS と RACK1（宿主コントロール）プライマー（5’ FITC またはビオチン修飾）の混合物
3. PBS と IFIT2（宿主バイオマーカー）プライマー（5’ FITC または DIG 修飾）の混合物
4. PBS と MxA（宿主バイオマーカー）プライマー（5’ FITC または DIG 修飾）の混合物
5. PBS と IFI6（宿主バイオマーカー）プライマー（5’ FITC または DIG 修飾）の混合物
6. PBS と IFIT3（宿主バイオマーカー）プライマー（5’ FITC または DIG 修飾）の混合物
7. PBS と IRF9（宿主バイオマーカー）プライマー（5’ FITC または DIG 修飾）の混合物
8. PBS と OAS2（宿主バイオマーカー）プライマー（5’FITC または DIG 修飾）の混合物

図２５

【配列表】

2022547023000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/049290

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - B01L 3/00; C12Q 1/6813; C12Q 1/6844; C12Q 1/6876 (2020.01)
CPC - B01L 2300/0819; B01L 2300/0877; C12Q 1/6876; C12Q 2600/112; C12Q 2600/158 (2020.08)

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X – Y	US 2011/0183856 A1 (AGAN et al) 28 July 2011 (28.07.2011) entire document	40 --- 41-46
X -- Y	WO 2010/060999 A1 (VERENIGING VU-WINDESHEIM (SHORT NAME) et al) 03 June 2010 (03.06.2010) entire document	48, 50, 52, 53, 65, 66 --- 12, 24, 39, 51, 74
X -- Y	US 2018/0356405 A1 (ESSENLIX CORP.) 13 December 2018 (13.12.2018) entire document	54 --- 51
X	US 2016/0208331 A1 (WASHINGTON UNIVERSITY) 21 July 2016 (21.07.2016) entire document	55a, 55b, 58, 59
X --- Y	US 2019/0194728 A1 (IMMUNEXPRESS PTY LTD) 27 June 2019 (27.06.2019) entire document	56, 60, 67-71, 75 --- 41-44, 72-74
X	US 2019/0125316 A1 (NEXTGEN JANE, INC.) 02 May 2019 (02.05.2019) entire document	57, 61
X	US 2014/0179807 A1 (CHAUSSABEL et al) 26 June 2014 (26.06.2014) entire document	62-64
Y	WO 2005/001113 A2 (THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY et al) 06 January 2005 (06.01.2005) entire document	1-33, 35, 38, 39

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 December 2020	02 FEB 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/049290

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/071051 A1 (THE BROAD INSTITUTE, INC. et al) 11 April 2019 (11.04.2019) entire document	1-33, 35, 38, 39
Y	US 2017/0321262 A1 (ALERE SAN DIEGO INC.) 09 November 2017 (09.11.2017) entire document	4, 15, 27, 46, 73
Y	WO 2019/037828 A1 (ZOETIS SERVICES LLC) 28 February 2019 (28.02.2019) entire document	6, 20
Y	WO 2018/186930 A1 (MYOMICSDX, INC) 11 October 2018 (11.10.2018) entire document	9, 23
Y	US 2018/0163277 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPT. OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 14 June 2018 (14.06.2018) entire document	45, 72
A	IN 2010MU00471 A (CHAUHAN ET AL.) 07 January 2011 (07.01.2011) entire document	1-33, 35, 38-46, 48, 50-54, 55a, 55b, 56-75
A	RAYMOND et al. "X-Linked Adrenoleukodystrophy," GeneReviews, 15 February 2018 (15.02.2018), University of Washington, Seattle, Pgs. 1-17. entire document	1-33, 35, 38-46, 48, 50-54, 55a, 55b, 56-75

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/049290

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

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

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1-3, 5, and 469-480 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/049290

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 34, 36, 37, 47, 49
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

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

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

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

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｑ	*1/6837(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6837	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/44 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/44		
Ｃ１２Ｑ	*1/6888(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6888	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ	*1/6869(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6869	Ｚ	

(32)優先日 令和2年4月7日(2020.4.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ツ特許事務所
(72)発明者 ソーヤー，サラ，エル．
アメリカ合衆国 コロラド州 ８０３０２，ボルダー，１０番ストリート ９６６
(72)発明者 メイヤーソン，ニコラス，アール．
アメリカ合衆国 コロラド州 ８００２０，ブルームフィールド，ジェイド ストリート ３７０
(72)発明者 ペイジ，カミール，エル．
アメリカ合衆国 コロラド州 ８００２１，ウェストミンスター，ムーア コート １０６０５
(72)発明者 ヤン，チィン
アメリカ合衆国 コロラド州 ８０５０１，ロングモント，ユニット シー，サウス コルヤー ストリート １３１８
(72)発明者 ダウエル，ロビン
アメリカ合衆国 コロラド州 ８００２０，ブルームフィールド，ダフネ ストリート １６５７

Ｆターム（参考） 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ10 QR08 QR42 QR55 QR62 QS24
QS25 QS33 QS34 QX01