

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-516683

(P2023-516683A)

(43)公表日 令和5年4月20日(2023.4.20)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/70 (2006.01)	C 1 2 Q 1/70	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/6888(2018.01)	C 1 2 Q 1/6888	Z Z N A
C 1 2 Q 1/686(2018.01)	C 1 2 Q 1/686	Z
C 1 2 N 15/50 (2006.01)	C 1 2 N 15/50	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全100頁)

(21)出願番号	特願2022-552805(P2022-552805)	(71)出願人	500169900
(86)(22)出願日	令和3年3月4日(2021.3.4)		ジェン・プローブ・インコーポレーテッド
(85)翻訳文提出日	令和4年10月21日(2022.10.21)		アメリカ合衆国カリフォルニア州921
(86)国際出願番号	PCT/US2021/020839		21, サン・ディエゴ, ジェネティック
(87)国際公開番号	WO2021/178644		・センター・ドライブ 10210
(87)国際公開日	令和3年9月10日(2021.9.10)		
(31)優先権主張番号	62/985,139	(74)代理人	100078282
(32)優先日	令和2年3月4日(2020.3.4)		弁理士 山本 秀策
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100113413
(31)優先権主張番号	63/010,186		弁理士 森下 夏樹
(32)優先日	令和2年4月15日(2020.4.15)	(74)代理人	100181674
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 飯田 貴敏
(31)優先権主張番号	63/020,007	(74)代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74)代理人	230113332
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 SARS-COV-2 核酸を検出するための組成物および方法

(57)【要約】

SARS-COV-2 核酸の検出のための、増幅用オリゴマーをはじめとする核酸オリゴマー、検出用プローブ、および捕捉用プローブが、開示される。開示されるオリゴマーを使用する特異的核酸増幅および検出方法、ならびに対応する製剤、反応混合物およびキット、ならびに乾燥製剤から水性反応混合物を調製するための関連方法も、開示される。一部の態様では、本発明は、試料中の SARS-COV-2 の存在または非存在を決定するための組成物および／またはキットを提供する。

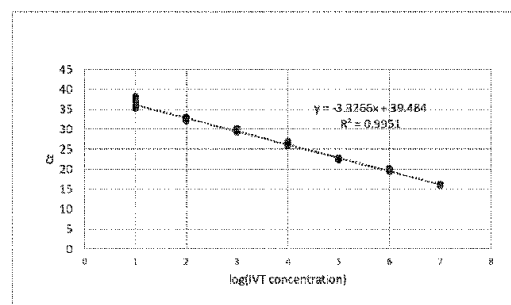


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の SARS-CoV-2 の存在または非存在を決定するための組成物またはキットであって、

(a) SARS-CoV-2 標的核酸の標的領域を増幅することができる第 1 および第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーを含む第 1 の増幅用オリゴマーの組合せであって、

(i) 前記第 1 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、18～27 の連続するヌクレオチドの長さの、第 1 の SARS-CoV-2 特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 26 に含有され、配列番号 27 または配列番号 28 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(ii) 前記第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、18～23 の連続するヌクレオチドの長さの、第 2 の SARS-CoV-2 特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 85 に含有され、配列番号 86、配列番号 87 または配列番号 88 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、第 1 の増幅用オリゴマーの組合せと、

(b) SARS-CoV-2 標的核酸の標的領域を増幅することができる第 1 および第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーを含む第 2 の増幅用オリゴマーの組合せであって、

(i) 前記第 1 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、20～23 の連続するヌクレオチドの長さの、第 1 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 29 に含有され、配列番号 30、配列番号 31 または配列番号 111 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(ii) 前記第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、16～27 の連続するヌクレオチドの長さの、第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 89 に含有され、配列番号 90、配列番号 112 または配列番号 113 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、第 2 の増幅用オリゴマーの組合せとを含む、組成物またはキット。

【請求項 2】

(a) (i) の前記第 1 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 12、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20 もしくは配列番号 21 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有し、0～7 ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは (a) (ii) の前記第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、配列番号 13、配列番号 71、配列番号 72、配列番号 73、配列番号 74 もしくは配列番号 75 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有し、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、請求項 1 に記載の組成物またはキット。

【請求項 3】

(a) (i) の前記第 1 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 12、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20 もしくは配列番号 21 のヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有し、0～7 ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは (a) (ii) の前記第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 13、配

列番号 7 1、配列番号 7 2、配列番号 7 3、配列番号 7 4 もしくは配列番号 7 5 のヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有し、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、請求項 2 に記載の組成物またはキット。

【請求項 4】

(b) (i) の前記第 1 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 1 5、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4 もしくは配列番号 2 5 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有し、0～7 ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは (b) (ii) の前記第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 1 6、配列番号 7 6、配列番号 7 7、配列番号 7 9、配列番号 8 0、配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3 もしくは配列番号 8 4 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有し、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

10

【請求項 5】

(b) (i) の前記第 1 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 1 5、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4 もしくは配列番号 2 5 のヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有し、0～7 ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは (b) (ii) の前記第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 1 6、配列番号 7 6、配列番号 7 7、配列番号 7 9、配列番号 8 0、配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3 もしくは配列番号 8 4 のヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有し、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、請求項 4 に記載の組成物またはキット。

20

【請求項 6】

試料中の SARS-CoV-2 の存在または非存在を決定するための組成物またはキットであって、SARS-CoV-2 標的核酸の標的領域を増幅することができる第 1 および第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーを含む増幅用オリゴマーの組合せを含み、

30

(a) 前記第 1 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、18～27 の連続するヌクレオチドの長さの、標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 2 6 に含有され、配列番号 2 7 または配列番号 2 8 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(b) 前記第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、18～23 の連続するヌクレオチドの長さの、第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 8 5 に含有され、配列番号 8 6、配列番号 8 7 または配列番号 8 8 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、組成物またはキット。

40

【請求項 7】

前記第 1 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 1 2、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0 もしくは配列番号 2 1 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有し、0～7 ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは前記第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 1 3、配列番号 7 1、配列番号 7 2、配列番号 7 3、配列番号 7 4 もしくは配列番号 7 5 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA

50

RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項6に記載の組成物またはキット。

【請求項8】

前記第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号12、配列番号18、配列番号19、配列番号20もしくは配列番号21のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは前記第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号13、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74もしくは配列番号75のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項7に記載の組成物またはキット。

10

【請求項9】

試料中のSARS-CoV-2の存在または非存在を決定するための組成物またはキットであって、SARS-CoV-2標的核酸の標的領域を増幅することができる第1および第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーを含む増幅用オリゴマーの組合せを含み、

(a) 前記第1のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、20～23の連続するヌクレオチドの長さである、第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号29に含有され、配列番号30、配列番号31または配列番号111のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

20

(b) 前記第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、16～27の連続するヌクレオチドの長さの、第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号89に含有され、配列番号90、配列番号112または配列番号113のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、組成物またはキット。

【請求項10】

前記第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号15、配列番号22、配列番号23、配列番号24もしくは配列番号25のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは前記第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号16、配列番号76、配列番号77、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83もしくは配列番号84のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項9に記載の組成物またはキット。

30

【請求項11】

前記第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号15、配列番号22、配列番号23、配列番号24もしくは配列番号25のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは前記第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号16、配列番号76、配列番号77、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83もしくは配列番号84のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項10に記載の組成物またはキット。

40

【請求項12】

SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含むSARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーを含む、組成物またはキットであつ

50

て、前記標的にハイブリダイズする配列が、(i) 19～27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号50に含有され、配列番号51、配列番号52、配列番号53もしくは配列番号114のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有するか、または(ii) 25～29の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号54に含有され、配列番号55、配列番号56もしくは配列番号115のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、組成物またはキット。

【請求項13】

前記SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号14、配列番号17、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号107、配列番号108、配列番号109または配列番号110のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項12に記載の組成物またはキット。

10

【請求項14】

前記SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号14、配列番号17、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号107、配列番号108、配列番号109または配列番号110のヌクレオチド配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項13に記載の組成物またはキット。

20

【請求項15】

試料中のSARS-CoV-2核酸を増幅するための製剤であって、

(a) SARS-CoV-2標的核酸の標的領域を増幅することができる第1および第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーを含む第1の増幅用オリゴマーの組合せであって、

30

(i) 前記第1のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、18～27の連続するヌクレオチドの長さの、第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号26に含有され、配列番号27または配列番号28のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(ii) 前記第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、18～23の連続するヌクレオチドの長さの、第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号85に含有され、配列番号86、配列番号87または配列番号88のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、第1の増幅用オリゴマーの組合せと、

40

(b) SARS-CoV-2標的核酸の標的領域を増幅することができる第1および第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーを含む第2の増幅用オリゴマーの組合せであって、

(i) 前記第1のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、20～23の連続するヌクレオチドの長さの、第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号29に含有され、配列番号30、配列番号31または配列番号111のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(ii) 前記第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、16～27の

50

連続するヌクレオチドの長さの、第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号89に含有され、配列番号90、配列番号112または配列番号113のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、第2の増幅用オリゴマーの組合せと、

(c) 緩衝剤と

を含む、製剤。

【請求項16】

(a) (i) の前記第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号12、配列番号18、配列番号19、配列番号20もしくは配列番号21、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形であり、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは(a) (ii) の前記第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号13、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74もしくは配列番号75、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形であり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項15に記載の製剤。

10

【請求項17】

(b) (i) の前記第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号15、配列番号22、配列番号23、配列番号24もしくは配列番号25、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形であり、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは(b) (ii) の前記第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号16、配列番号76、配列番号77、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83もしくは配列番号84、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形であり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項15または16に記載の製剤。

20

【請求項18】

乾燥組成物である、請求項15から17のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項19】

試料中のSARS-CoV-2核酸を増幅するための製剤であって、

(a) SARS-CoV-2 標的核酸の標的領域を増幅することができる第1および第2のSARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーを含む増幅用オリゴマーの組合せであって、前記第1のSARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、18～27の連続するヌクレオチドの長さの、第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号26に含有され、配列番号27または配列番号28のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、前記第2のSARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、18～23の連続するヌクレオチドの長さの、第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号85に含有され、配列番号86、配列番号87または配列番号88のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、増幅用オリゴマーの組合せと、

30

40

(b) 緩衝剤と

を含む、製剤。

【請求項20】

前記第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号12、配列番号18、配列番号19、配列番号20もしくは配列番号21、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形であり、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは前記第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号13、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74もしくは配列番号75、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形であ

50

り、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項19に記載の製剤。

【請求項21】

乾燥組成物である、請求項19または20に記載の製剤。

【請求項22】

試料中のSARS-CoV-2核酸を増幅するための製剤であって、

(a) SARS-CoV-2標的核酸の標的領域を増幅することができる第1および第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーを含む増幅用オリゴマーの組合せであって、前記第1のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、20～23の連続するヌクレオチドの長さの、第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号29に含有され、配列番号30、配列番号31または配列番号111のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、前記第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、16～27の連続するヌクレオチドの長さの、第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号89に含有され、配列番号90、配列番号112または配列番号113のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、増幅用オリゴマーの組合せと、

(b) 緩衝剤と

を含む、製剤。

【請求項23】

前記第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号15、配列番号22、配列番号23、配列番号24もしくは配列番号25、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形であり、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは前記第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号16、配列番号76、配列番号77、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83もしくは配列番号84、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形であり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項22に記載の製剤。

【請求項24】

乾燥組成物である、請求項22または23に記載の製剤。

【請求項25】

試料中のSARS-CoV-2を検出するための製剤であって、

(a) 緩衝剤と、

(b) SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含むSARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーとを含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、

(i) 19～27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号50に含有され、配列番号51、配列番号52、配列番号53もしくは配列番号114のヌクレオチド配列と最大で1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有するか、または

(ii) 25～29の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号54に含有され、配列番号55、配列番号56もしくは配列番号115のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、製剤。

【請求項26】

前記SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号14、配列番号17、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号107、配列番号108、配列番号109および配列番号110、

10

20

30

40

50

ならびにそのDNA等価物、RNA等価物またはDNA／RNAキメラ形、ならびに0～7ヌクレオチドアナログを含むものからなる群から選択される、請求項25に記載の製剤。

【請求項27】

乾燥組成物である、請求項25または26に記載の製剤。

【請求項28】

請求項18、21、24、および27のいずれか一項に記載の乾燥組成物を含む、キット。

【請求項29】

再構成試薬をさらに含み、前記乾燥組成物が、前記キット内の第1のバイアルの中にあり、前記再構成試薬が、前記キット内の第2のバイアルの中にある、請求項28に記載のキット。

10

【請求項30】

試料中のSARS-CoV-2の存在または非存在を決定するための水性反応混合物を調製するための方法であって、水性反応混合物を作製するために実施形態18、21、24および27のいずれか一項に記載の乾燥組成物を再構成試薬と混ぜ合わせるステップを含む方法。

【請求項31】

試料中のSARS-CoV-2の存在または非存在を決定するための方法であって、

(a) 試料を少なくとも第1の増幅用オリゴマーの組合せおよび第2の増幅用オリゴマーの組合せと接触させるステップであって、

20

(i) 前記第1の増幅用オリゴマーの組合せが、SARS-CoV-2標的核酸の第1の標的領域を増幅することができる第1および第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーを含み、

(1) 前記第1のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、18～27の連続するヌクレオチドの長さの、第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号26に含有され、配列番号27または配列番号28のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(2) 前記第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、18～23の連続するヌクレオチドの長さの、第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号85に含有され、配列番号86、配列番号87または配列番号88のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

30

(ii) 第2の増幅用オリゴマーの組合せが、SARS-CoV-2標的核酸の第2の標的領域を増幅することができる第1および第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーを含み、

(1) 前記第1のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、20～23の連続するヌクレオチドの長さの、第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号29に含有され、配列番号30、配列番号31または配列番号111のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

40

(2) 前記第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、16～27の連続するヌクレオチドの長さの、第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号89に含有され、配列番号90、配列番号112または配列番号113のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、ステップと、

(b) *in vitro*核酸増幅に好適な条件で前記試料をインキュベートするステップであって、任意のSARS-CoV-2標的核酸が、前記試料中に存在する場合、前記

50

第1または第2のSARS-CoV-2標的領域の少なくとも一方に対応する1つまたは複数のアンプリコンを生成するための鋳型として使用される、ステップと、

(c) 前記1つまたは複数のアンプリコンの存在または非存在を検出し、それによって前記試料中のSARS-CoV-2の存在または非存在を決定するステップとを含む方法。

【請求項32】

(a) (i) の前記第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号12、配列番号18、配列番号19、配列番号20もしくは配列番号21のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは(a) (ii) の前記第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号13、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74もしくは配列番号75のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項31に記載の方法。

10

【請求項33】

(a) (i) の前記第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号12、配列番号18、配列番号19、配列番号20もしくは配列番号21のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは(a) (ii) の前記第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号13、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74もしくは配列番号75のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項32に記載の方法。

20

【請求項34】

(b) (i) の前記第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号15、配列番号22、配列番号23、配列番号24もしくは配列番号25のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは(b) (ii) の前記第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号16、配列番号76、配列番号77、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83もしくは配列番号84のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項31から33のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項35】

(b) (i) の前記第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号15、配列番号22、配列番号23、配列番号24もしくは配列番号25のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは(b) (ii) の前記第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号16、配列番号76、配列番号77、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83もしくは配列番号84のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項34に記載の方法。

40

【請求項36】

試料中のSARS-CoV-2の存在または非存在を決定するための方法であって、

(a) 試料を、SARS-CoV-2標的核酸の標的領域を増幅することができる第1

50

および第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーを含む増幅用オリゴマーの組合せと接触させるステップであって、

(i) 前記第1のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、18～27の連続するヌクレオチドの長さの、第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号26に含有され、配列番号27または配列番号28のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(ii) 前記第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、18～23の連続するヌクレオチドの長さの、第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号85に含有され、配列番号86、配列番号87または配列番号88のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、

10

ステップと、

(b) *in vitro* 核酸増幅に好適な条件で前記試料をインキュベートするステップであって、任意のSARS-CoV-2標的核酸が、前記試料中に存在する場合、前記SARS-CoV-2標的領域に対応するアンプリコンを生成するための鋳型として使用される、ステップと、

(c) 前記アンプリコンの存在または非存在を検出し、それによって前記試料中のSARS-CoV-2の存在または非存在を決定するステップとを含む方法。

20

【請求項37】

前記第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号12、配列番号18、配列番号19、配列番号20もしくは配列番号21のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは前記第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号13、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74もしくは配列番号75のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項36に記載の方法。

30

【請求項38】

前記第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号12、配列番号18、配列番号19、配列番号20もしくは配列番号21のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは前記第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号13、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74もしくは配列番号75のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項37に記載の方法。

40

【請求項39】

試料中のSARS-CoV-2の存在または非存在を決定するための方法であって、

(a) 試料を、SARS-CoV-2標的核酸の標的領域を増幅することができる第1および第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーを含む増幅用オリゴマーの組合せと接触させるステップであって、

(i) 前記第1のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、20～23の連続するヌクレオチドの長さの、第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号29に含有され、配列番号30、配列番号31または配列番号111のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

50

(i i) 前記第 2 の S A R S - C o V - 2 特異的増幅用オリゴマーが、16～27の連続するヌクレオチドの長さの、第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、配列番号89に含有され、配列番号90、配列番号112または配列番号113のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、ステップと、

(b) i n v i t r o 核酸増幅に好適な条件で前記試料をインキュベートするステップであって、任意のSARS-CoV-2標的核酸が、前記試料中に存在する場合、前記SARS-CoV-2標的領域に対応するアンプリコンを生成するための鋳型として使用される、ステップと、

(c) 前記アンプリコンの存在または非存在を検出し、それによって前記試料中のSARS-CoV-2の存在または非存在を決定するステップとを含む方法。

【請求項40】

前記第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号15、配列番号22、配列番号23、配列番号24もしくは配列番号25のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは前記第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号16、配列番号76、配列番号77、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83もしくは配列番号84のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

前記第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号15、配列番号22、配列番号23、配列番号24もしくは配列番号25のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは前記第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号16、配列番号76、配列番号77、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83もしくは配列番号84のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有し、0～7ヌクレオチドアナログを含む、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

試料中のSARS-CoV-2および少なくとも1つの他の病原体の存在または非存在を決定するためのマルチプレックス方法であって、SARS-CoV-2の前記存在または非存在が、請求項31から38のいずれか一項に記載の方法を使用して決定される、マルチプレックス方法。

【請求項43】

SARS-CoV-2、ならびにインフルエンザA型、インフルエンザB型、呼吸器合胞体ウイルスA型、呼吸器合胞体ウイルスB型、パラインフルエンザウイルス1型、パラインフルエンザウイルス2型、パラインフルエンザウイルス3型、パラインフルエンザウイルス4型、アデノウイルス、メタニューモウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス229E型、コロナウイルスNL63型、コロナウイルスHKU1型、コロナウイルスOC43型、SARS-CoV(SARS)、およびMERS-CoVからなる群から選択される1つまたは複数の病原体の、存在または非存在を決定する、請求項42に記載のマルチプレックス方法。

【請求項44】

前記アンプリコンの存在または非存在を検出するステップが、前記試料を、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含むSARS-Co

10

20

30

40

50

V-2 特異的検出用プローブオリゴマーと接触させることを含み、前記標的にハイブリダイズする配列が、(i) 19~27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号50に含有され、配列番号51、配列番号52、配列番号53もしくは配列番号114のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有するか、または(ii) 25~29の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号54に含有され、配列番号55、配列番号56もしくは配列番号115のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、請求項31から41のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

関連出願への相互参照

本願は、2020年3月4日出願した米国特許仮出願第62/985,139号、2020年4月15日出願した米国特許仮出願第63/010,186号、2020年5月4日出願した米国特許仮出願第63/020,007号、および2020年9月15日出願した米国特許仮出願第63/078,790号の利益を主張するものであり、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

ファイルDIA-0116-05__SeqList.txtに記載の配列表は、サイズ65キロバイトであり、2021年3月4日に作成され、これにより参照により本明細書に組み込まれる。

20

【背景技術】

【0003】

背景

コロナウイルスは、鳥類、およびヒトを含む哺乳動物を感染させる、RNAウイルスの1科である。コロナウイルスは、アルファコロナウイルス、ベータコロナウイルス、ガンマコロナウイルスおよびデルタコロナウイルスとして公知の4つの主要な亜群を有する、Coronaviridae科に属する。ヒトコロナウイルスは、アルファコロナウイルス229E型およびNL63型、ならびにベータコロナウイルスOC43型、HKU1型、SARS-CoV（重症急性呼吸器症候群、すなわちSARSの原因となるコロナウイルス）、SARS-CoV-2（旧称2019-nCoVまたは武漢CoV）、ならびにMERS-CoV（中東呼吸器症候群、すなわちMERSの原因となるコロナウイルス）を含む。

30

【0004】

ヒトコロナウイルスは、全上気道および下気道感染症のおおよそ10~15%の原因となる。それらは、18歳未満の小児、高齢者、および免疫障害を有する個体の重大な入院加療の主原因となる。4つのヒトコロナウイルス（229E型、HKU1型、NL63型、およびOC43型）は、細気管支炎および肺炎をはじめとする、様々な呼吸器転帰に関連付けられている（Gaunt et al., Journal of Clinical Microbiology 48: 2940-2947, 2010）。急性呼吸器疾患の最大10%が、ヒトコロナウイルスNL63（NL63）型によって引き起こされる（Abdul-Rasool and Fielding, The Open Virology Journal 4:76-84, 2010）。NL63感染症の重要な側面は、他のヒトコロナウイルス、インフルエンザA型、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、パラインフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルスによる同時感染である（同文献を参照されたい）。小児では、コロナウイルスは、急性気道疾患、肺炎、およびクループに関連付けられており、これらは、多くの場合、入院加療につながる。1つの疫学的研究では、1471名の入院小児（<2年）のうち、207名（14%）は、ヒトコロナウイルスについて陽性であった（Dijkman et al., Journal of Clinical Virology 53:135-139, 2012）。2006年~2009年の間に英国のエディンバラで収集され

40

50

た11, 661の診断用呼吸器試料での大規模調査では、267(2.30%)は、少なくとも1つのコロナウイルスについて陽性であり、これは、全ウイルス検出の8.15%を占めた(Gaunt et al., 上掲を参照されたい)。検出されたコロナウイルスの11~41%は、他の呼吸器ウイルス(例えば、RSV)の検査で陽性の試料に存在した(同文献を参照されたい)。

【0005】

新興SARS-CoV-2は、重症下気道感染症(COVID-19)の原因となり得、世界保健機関によって世界的な緊急事態と宣言された。SARS-CoV-2は、中国、湖北省の武漢市において2019年12月初旬に始まった近年の肺炎大流行の原因である(Huang et al., Lancet (2020) v395, issue 10223, p.497)。これまでに、米国、カナダ、日本、オーストラリアおよび欧州におけるものを含む世界中の多くの輸出症例に加えて、何千ものヒトへの感染が中国で確認されている(China CDC, 2020)。

10

核酸検出に基づくいくつかの市販のアッセイが、臨床検体におけるヒトコロナウイルスOC43型、HKU1型、NL63型および229E型の検出に利用可能である。これらには、NxTAG(登録商標)Respiratory Pathogen Panel(Luminex)、BIOFIRE(登録商標)FILMARRAY(登録商標)Respiratory Panel(bioMerieux)、およびePlex(登録商標)Respiratory Pathogen Panel(GenMark Diagnostics)が含まれる。米国疾病対策センター(U.S. Center for Disease Control)は、その2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの緊急使用許可を受けた。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Gaunt et al., Journal of Clinical Microbiology 48:2940-2947, 2010

【非特許文献2】Abdul-Rasool and Fielding, The Open Virology Journal 4:76-84, 2010

【非特許文献3】Dijkman et al., Journal of Clinical Virology 53:135-139, 2012

30

【非特許文献4】Huang et al., Lancet (2020) v395, issue 10223, p.497

【非特許文献5】China CDC, 2020

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

要旨

一部の態様では、本発明は、試料中のSARS-CoV-2の存在または非存在を決定するための組成物および／またはキットを提供する。組成物および／またはキットは、一般に、SARS-CoV-2核酸の標的領域を増幅することができる第1および第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーを含む少なくとも1つの増幅用オリゴマーの組合せを含む。記載されるオリゴヌクレオチド、組成物、製剤、キットおよび方法は、SARS-CoV-2における標的核酸の等温増幅に使用することができる。等温反応は、転写媒介増幅(TMA)であり得るが、これに限定されない。

40

【0008】

別の態様では、本発明は、試料中のSARS-CoV-2核酸を増幅するための製剤を提供する。製剤は、一般に、(i)SARS-CoV-2標的核酸の標的領域を増幅することができる第1および第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーを含む、少なくとも1つの増幅用オリゴマーの組合せと、(ii)緩衝剤とを含む。一部の実施形態では、製剤は、乾燥組成物である。一部の実施形態では、SARS-CoV-2核酸を増

50

幅するためのそのような乾燥組成物を含むキットが記載される。一部の実施形態では、試料中の S A R S - C o V - 2 の存在または非存在を決定するための水性反応混合物を調製するための方法であって、記載される乾燥組成物を水性再構成試薬と混ぜ合わせるステップを一般に含む方法が記載される。

【0009】

一部の態様では、試料中の S A R S - C o V - 2 の存在または非存在を決定するための方法が記載される。一部の実施形態では、方法は、第1および第2の S A R S - C o V - 2 特異的増幅用オリゴマーを含む少なくとも1つの増幅用オリゴマーの組合せを利用して *i n v i t r o* 核酸増幅反応を行って、少なくとも1つの S A R S - C o V - 2 標的領域に対応する1つまたは複数のアンプリコンを生成するステップと、1つまたは複数のアンプリコンの存在または非存在を検出するステップとを含む。一部の実施形態では、方法は、試料中の S A R S - C o V - 2 および少なくとも1つの他の病原体の存在を決定するためのマルチプレックス方法である。

10

これらの態様の代表的な実施形態が、下でさらに示される。

【0010】

実施形態1. 試料中の S A R S - C o V - 2 の存在または非存在を決定するための組成物またはキットであって、

(a) S A R S - C o V - 2 標的核酸の第1の標的領域を増幅することができる第1および第2の S A R S - C o V - 2 領域1 特異的増幅用オリゴマーを含む第1の増幅用オリゴマーの組合せであって、

20

(i) 第1の S A R S - C o V - 2 領域1 特異的増幅用オリゴマーが、第1の S A R S - C o V - 2 領域1 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、18~27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号26に含有され、配列番号27または配列番号28のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(ii) 第2の S A R S - C o V - 2 領域1 特異的増幅用オリゴマーが、第2の S A R S - C o V - 2 領域1 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、18~23の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号85に含有され、配列番号86、配列番号87または配列番号88のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、第1の増幅用オリゴマーの組合せと、

30

(b) S A R S - C o V - 2 標的核酸の第2の標的領域を増幅することができる第1および第2の S A R S - C o V - 2 領域2 特異的増幅用オリゴマーを含む第2の増幅用オリゴマーの組合せであって、

(i) 第1の S A R S - C o V - 2 領域2 特異的増幅用オリゴマーが、第1の S A R S - C o V - 2 領域2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、20~23の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号29に含有され、配列番号30、配列番号31または配列番号111のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(ii) 第2の S A R S - C o V - 2 領域2 特異的増幅用オリゴマーが、第2の S A R S - C o V - 2 領域2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、16~27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号89に含有され、配列番号90、配列番号112または配列番号113のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、第2の増幅用オリゴマーの組合せと

40

を含む、組成物またはキット。

【0011】

実施形態2. (a) の第1の増幅用オリゴマーの組合せにより増幅可能なアンプリコンの中に含有される標的配列にハイブリダイズするように構成された第1の検出用プローブオリゴマーをさらに含み、第1の検出用プローブオリゴマーが、19~27の連続するヌ

50

クレオチドの長さである、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含む、実施形態 1 の組成物またはキット。

【0012】

実施形態 3. (b) の第 2 の増幅用オリゴマーの組合せにより増幅可能なアンプリコンの中に含有される標的配列にハイブリダイズするように構成された第 2 の検出用プローブオリゴマーをさらに含み、第 2 の検出用プローブオリゴマーが、25～29 の連続するヌクレオチドの長さである、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含む、実施形態 1 または 2 の組成物またはキット。

【0013】

実施形態 4. (a) (i) の第 1 の SARS-CoV-2 領域 1 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 12、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20 もしくは配列番号 21 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは (a) (ii) の第 2 の SARS-CoV-2 領域 1 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 13、配列番号 71、配列番号 72、配列番号 73、配列番号 74 もしくは配列番号 75 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 1、2 または 3 の組成物またはキット。

【0014】

実施形態 5. (b) (i) の第 1 の SARS-CoV-2 領域 2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 15、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24 もしくは配列番号 25 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは (b) (ii) の第 2 の SARS-CoV-2 領域 2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 16、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 79、配列番号 80、配列番号 81、配列番号 82、配列番号 83 もしくは配列番号 84 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 1、2、3 または 4 のキットまたは組成物。

【0015】

実施形態 5. 1. (a) (i) の第 1 の SARS-CoV-2 領域 1 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 12、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20 もしくは配列番号 21 のヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含み；(a) (ii) の第 2 の SARS-CoV-2 領域 1 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 13、配列番号 71、配列番号 72、配列番号 73、配列番号 74 もしくは配列番号 75 のヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含み；(b) (i) の第 1 の SARS-CoV-2 領域 2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 15、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24 もしくは配列番号 25 のヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含み；ならびに／あるいは (b) (ii) の第 2 の SARS-CoV-2 領域 2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 16、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 79、配列番号 80、配列番号 81、配列番号 82、配列番号 83 もしくは配列番号 84 のヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 4 または 5 の組成物またはキット。

【0016】

実施形態6．SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号14、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号107または配列番号108のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態2、4または5aのいずれか1つの組成物またはキット。

【0017】

実施形態7．SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号17、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号109または配列番号110のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態3、5または5aのいずれか1つの組成物またはキット。

10

【0018】

実施形態8．第1および／または第2の検出用プローブオリゴマーが、検出可能な標識をさらに含む、実施形態2、3、6および7のいずれか1つの組成物またはキット。

【0019】

実施形態9．検出可能な標識が、蛍光または化学発光標識である、実施形態8の組成物またはキット。

20

【0020】

実施形態10．検出可能な標識が、蛍光標識であり、第1および／または第2の検出用プローブオリゴマーが、非蛍光クエンチャーをさらに含む、実施形態9の組成物またはキット。

【0021】

実施形態11．第1および／または第2の検出用プローブオリゴマーが、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に連結された自己相補配列をさらに含み、必要に応じて、自己相補配列が、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列の5'末端に連結した、実施形態2、3、6、7、8、9および10のいずれか1つの組成物またはキット。

30

【0022】

実施形態12．自己相補配列が、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に非ヌクレオチドリンカーによって連結されている、実施形態11の組成物またはキット。

【0023】

実施形態13．第1および／または第2の検出用プローブオリゴマーが、分子ビーコンまたは分子トーチである、実施形態2～3および6～12のいずれか1つの組成物またはキット。

40

【0024】

実施形態14．(a)(ii)の第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、その5'末端でプロモーター配列に連結されている、実施形態1～13のいずれか1つの組成物またはキット。

【0025】

実施形態15．プロモーター配列が、配列番号11と実質的に同一である、実施形態14の組成物またはキット。

【0026】

実施形態16．(a)(ii)の第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61もしくは

50

配列番号 62 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含むかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 14 の組成物またはキット。

【0027】

実施形態 17. (b) (ii) の第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、その 5' 末端でプロモーター配列に連結されている、実施形態 1～16 のいずれか 1 つの組成物またはキット。

【0028】

実施形態 18. プロモーター配列が、配列番号 11 と実質的に同一である、実施形態 17 の組成物またはキット。

【0029】

実施形態 19. (b) (ii) の第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、配列番号 63、配列番号 64、配列番号 65、配列番号 66、配列番号 67、配列番号 68、配列番号 69、配列番号 70 もしくは配列番号 78 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含むかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 17 の組成物またはキット。

【0030】

実施形態 20. 試料中の SARS-CoV-2 の存在または非存在を決定するための組成物またはキットであって、SARS-CoV-2 標的核酸の標的領域を増幅することができる第 1 および第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーを含む増幅用オリゴマーの組合せを含み、

(a) 第 1 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、第 1 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、18～27 の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号 26 に含有され、配列番号 27 または配列番号 28 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(b) 第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、18～23 の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号 85 に含有され、配列番号 86、配列番号 87 または配列番号 88 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、組成物またはキット。

【0031】

実施形態 21. 第 1 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 12、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20 もしくは配列番号 21 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 13、配列番号 71、配列番号 72、配列番号 73、配列番号 74 もしくは配列番号 75 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 20 の組成物またはキット。

【0032】

実施形態 22. 第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、その 5' 末端でプロモーター配列に結合されている、実施形態 20 または 21 の組成物またはキット。

【0033】

10

20

30

40

50

実施形態 23. プロモーター配列が、配列番号 11 と実質的に同一である、実施形態 22 の組成物またはキット。

【0034】

実施形態 24. 第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、配列番号 57、配列番号 58、配列番号 59、配列番号 60、配列番号 61 もしくは配列番号 62 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含むかもしくはそれからなる連続するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含み、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 22 の組成物またはキット。

【0035】

実施形態 25. SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーをさらに含み、検出用プローブオリゴマーが、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、19～27 の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号 50 に含有され、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 53 または配列番号 114 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、実施形態 20～24 のいずれか 1 つの組成物またはキット。

【0036】

実施形態 26. SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 14、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 107 または配列番号 108 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、その DNA 等価物、RNA 等価物または DNA/RNA キメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 25 の組成物またはキット。

【0037】

実施形態 27. SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 14、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 103、配列番号 104、配列番号 107 または配列番号 108 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、その DNA 等価物、RNA 等価物または DNA/RNA キメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 25 の組成物またはキット。

【0038】

実施形態 28. SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーが、検出可能な標識をさらに含む、実施形態 25～27 のいずれか 1 つの組成物またはキット。

【0039】

実施形態 29. 検出可能な標識が、蛍光または化学発光標識である、実施形態 28 の組成物またはキット。

【0040】

実施形態 30. 検出可能な標識が、蛍光標識であり、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーが、非蛍光クエンチャーをさらに含む、実施形態 29 の組成物またはキット。

【0041】

実施形態 31. SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーが、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に連結された自己相補配列をさらに含み、必要に応じて、自己相補配列が、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列の 5' 末端に連結した、実施形態 25、26 および 28～30 のいずれか 1 つの組成物またはキット。

10

20

30

40

50

【0042】

実施形態32．自己相補配列が、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に非ヌクレオチドリンカーによって連結されている、実施形態31の組成物またはキット。

【0043】

実施形態33．SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、分子ビーコンまたは分子トーチである、実施形態26および28～32のいずれか1つの組成物またはキット。

【0044】

実施形態34．試料中のSARS-CoV-2の存在または非存在を決定するための組成物またはキットであって、SARS-CoV-2標的核酸の標的領域を増幅することができる第1および第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーを含む増幅用オリゴマーの組合せを含み、

(a) 第1のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、20～23の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号29に含有され、配列番号30、配列番号31または配列番号111のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(b) 第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、16～27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号89に含有され、配列番号90、配列番号112または配列番号113のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、

組成物またはキット。

【0045】

実施形態35．第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号15、配列番号22、配列番号23、配列番号24もしくは配列番号25のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号16、配列番号76、配列番号77、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83もしくは配列番号84のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態34の組成物またはキット。

【0046】

実施形態36．第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、その5'末端でプロモーター配列に連結されている、実施形態34または35の組成物またはキット。

【0047】

実施形態37．プロモーター配列が、配列番号11と実質的に同一である、実施形態36の組成物またはキット。

【0048】

実施形態38．第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70もしくは配列番号78のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含むかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態36の組成物またはキット。

【0049】

実施形態39. SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーをさらに含み、検出用プローブオリゴマーが、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、25～29の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号54に含有され、配列番号55、配列番号56または配列番号115のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、実施形態34～38のいずれか1つの組成物またはキット。

【0050】

実施形態40. SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号17、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号109または配列番号110のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態39の組成物またはキット。

10

【0051】

実施形態41. 第2の検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号17、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号105、配列番号106、配列番号109または配列番号110のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態39の組成物またはキット。

20

【0052】

実施形態42. SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、検出可能な標識をさらに含む、実施形態39～41のいずれか1つの組成物またはキット。

【0053】

実施形態43. 検出可能な標識が、蛍光または化学発光標識である、実施形態42の組成物またはキット。

【0054】

実施形態44. 検出可能な標識が、蛍光標識であり、SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、非蛍光クエンチャーをさらに含む、実施形態43の組成物またはキット。

30

【0055】

実施形態45. SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に連結された自己相補配列をさらに含み、必要に応じて、自己相補配列が、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列の5'末端に連結した、実施形態39、40および42～44のいずれか1つの組成物またはキット。

【0056】

実施形態46. 自己相補配列が、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に非ヌクレオチドリinkerによって連結されている、実施形態45の組成物またはキット。

40

【0057】

実施形態47. SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、分子ビーコンまたは分子トーチである、実施形態40および42～46のいずれか1つの組成物またはキット。

【0058】

実施形態48. 1つまたは複数のSARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーを含む、組成物またはキットであって、SARS-CoV-2特異的検出用プローブオ

50

リゴマーが、(a) 19～27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号50に含有され、配列番号51、配列番号52、配列番号53または配列番号114のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含む、第1の検出用プローブオリゴマー；および(b) 25～29の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号54に含有され、配列番号55、配列番号56または配列番号115のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含む、第2の検出用プローブオリゴマーからなる群から選択される、組成物またはキット。

10

【0059】

実施形態49．第1および／または第2の検出用プローブオリゴマーが、配列番号14、配列番号17、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号107、配列番号108、配列番号109または配列番号110のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なる、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含み、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態48の組成物またはキット。

20

【0060】

実施形態50．1つまたは複数のSARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、配列番号14、配列番号17、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109および配列番号110、ならびにそのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形、ならびに0～7ヌクレオチドアナログを含むものからなる群から選択される配列を独立して含む、実施形態48の組成物またはキット。

30

【0061】

実施形態51．SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に連結された自己相補配列をさらに含み、必要に応じて、自己相補配列が、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列の5'末端に連結した、実施形態48または49の組成物またはキット。

【0062】

実施形態52．自己相補配列が、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に非ヌクレオチドリンカーによって連結されている、実施形態51の組成物またはキット。

40

【0063】

実施形態53．SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、検出可能な標識をさらに含む、実施形態48～52のいずれか1つの組成物またはキット。

【0064】

実施形態54．検出可能な標識が、蛍光または化学発光標識である、実施形態54の組成物またはキット。

【0065】

実施形態55．検出可能な標識が、蛍光標識であり、SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、非蛍光クエンチャーをさらに含む、実施形態55の組成物またはキット。

50

【0066】

実施形態56. SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーが、分子ビーコンまたは分子トーチである、実施形態48～49および51～55のいずれか1つの組成物またはキット。

【0067】

実施形態57. 試料中のSARS-CoV-2 核酸を増幅するための製剤であって、

(a) SARS-CoV-2 標的核酸の第1の標的領域を増幅することができる第1および第2のSARS-CoV-2 領域1 特異的増幅用オリゴマーを含む第1の増幅用オリゴマーの組合せであって、

(i) 第1のSARS-CoV-2 領域1 特異的増幅用オリゴマーが、第1のSARS-CoV-2 領域1 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、18～27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号26に含有され、配列番号27または配列番号28のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(ii) 第2のSARS-CoV-2 領域1 特異的増幅用オリゴマーが、第2のSARS-CoV-2 領域1 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、18～23の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号85に含有され、配列番号86、配列番号87または配列番号88のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、第1の増幅用オリゴマーの組合せと、

(b) SARS-CoV-2 標的核酸の第2の標的領域を増幅することができる第1および第2のSARS-CoV-2 領域2 特異的増幅用オリゴマーを含む第2の増幅用オリゴマーの組合せであって、

(i) 第1のSARS-CoV-2 領域2 特異的増幅用オリゴマーが、第1のSARS-CoV-2 領域2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、20～23の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号29に含有され、配列番号30、配列番号31または配列番号111のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(ii) 第2のSARS-CoV-2 領域2 特異的増幅用オリゴマーが、第2のSARS-CoV-2 領域2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、16～27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号89に含有され、配列番号90、配列番号112または配列番号113のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、第2の増幅用オリゴマーの組合せと、

(c) 緩衝剤とを含む、製剤。

【0068】

実施形態58. (a) (i) の第1のSARS-CoV-2 領域1 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号12、配列番号18、配列番号19、配列番号20もしくは配列番号21のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは(a) (ii) の第2のSARS-CoV-2 領域1 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号13、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74もしくは配列番号75のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態57の製剤。

【0069】

実施形態59. (b) (i) の第1のSARS-CoV-2 領域2 に特異的な標的にハ

イブリダイズする配列が、配列番号 15、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24 もしくは配列番号 25 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは (b) (ii) の第 2 の SARS-CoV-2 領域 2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 16、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 79、配列番号 80、配列番号 81、配列番号 82、配列番号 83 もしくは配列番号 84 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 57 または 58 の製剤。

10

【0070】

実施形態 60. (a) (ii) の第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、その 5' 末端でプロモーター配列に連結されている、実施形態 57 または 58 の製剤。

【0071】

実施形態 61. プロモーター配列が、配列番号 11 と実質的に同一である、実施形態 60 の製剤。

【0072】

実施形態 62. (a) (ii) 第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、配列番号 57、配列番号 58、配列番号 59、配列番号 60、配列番号 61 もしくは配列番号 62 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有するかもしくはそれからなる連続するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含み、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 61 の製剤。

20

【0073】

実施形態 63. (b) (ii) の第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、その 5' 末端でプロモーター配列に連結されている、実施形態 57～62 のいずれか 1 つの製剤。

【0074】

実施形態 64. プロモーター配列が、配列番号 11 と実質的に同一である、実施形態 63 の製剤。

30

【0075】

実施形態 65. (b) (ii) の第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、配列番号 63、配列番号 64、配列番号 65、配列番号 66、配列番号 67、配列番号 68、配列番号 69、配列番号 70 もしくは配列番号 78 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含むかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 64 の製剤。

【0076】

実施形態 66. (a) の第 1 の増幅用オリゴマーの組合せにより増幅可能なアンプリコンの中に含有される標的配列にハイブリダイズするように構成された第 1 の検出用プローブオリゴマーをさらに含み、第 1 の検出用プローブオリゴマーが、19～27 の連続するヌクレオチドの長さである、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含む、実施形態 57～65 のいずれか 1 つの製剤。

40

【0077】

実施形態 67. (b) の第 2 の増幅用オリゴマーの組合せにより増幅可能なアンプリコンの中に含有される標的配列にハイブリダイズするように構成された第 2 の検出用プローブオリゴマーをさらに含み、検出用プローブオリゴマーが、25～29 の連続するヌクレオチドの長さである、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含む、実施形態 57～66 のいずれか 1 つの製剤。

50

【0078】

実施形態68．SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号14、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号107または配列番号108のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態66の製剤。

【0079】

実施形態69．第1の検出用プローブオリゴマーの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号14、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号103、配列番号104、配列番号107または配列番号108のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態68の製剤。

【0080】

実施形態70．SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号17、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号109または配列番号110のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態67の製剤。

【0081】

実施形態71．第2の検出用プローブオリゴマーが、配列番号17、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号105、配列番号106、配列番号109または配列番号110のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態70の製剤。

【0082】

実施形態72．SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、検出可能な標識をさらに含む、実施形態66～71のいずれか1つの製剤。

【0083】

実施形態73．検出可能な標識が、蛍光または化学発光標識である、実施形態72の製剤。

【0084】

実施形態74．検出可能な標識が、蛍光標識であり、SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、非蛍光クエンチャーをさらに含む、実施形態73の製剤。

【0085】

実施形態75．増量剤、界面活性剤、ヌクレオチド三リン酸、酵素、および無機塩のうちの1つまたは複数を含む、実施形態57～74のいずれか1つの製剤。

【0086】

実施形態76．乾燥組成物である、実施形態57～75のいずれか1つの製剤。

【0087】

実施形態77．試料中のSARS-CoV-2核酸を増幅するための製剤であって、

(a) SARS-CoV-2標的核酸の標的領域を増幅することができる第1および第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーを含む増幅用オリゴマーの組合せであって、第1のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配

10

20

30

40

50

列が、18～27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号26に含有され、配列番号27または配列番号28のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、18～23の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号85に含有され、配列番号86、配列番号87または配列番号88のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、増幅用オリゴマーの組合せと、

(b) 緩衝剤と

を含む、製剤。

10

【0088】

実施形態78. 第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号12、配列番号18、配列番号19、配列番号20もしくは配列番号21のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号13、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74もしくは配列番号75のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態77の製剤。

20

【0089】

実施形態79. 第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、その5'末端でプロモーター配列に連結されている、実施形態77または78の製剤。

【0090】

実施形態80. プロモーター配列が、配列番号11と実質的に同一である、実施形態79の製剤。

【0091】

実施形態81. 第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61もしくは配列番号62のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含むかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態79の製剤。

30

【0092】

実施形態82. SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーをさらに含み、検出用プローブオリゴマーが、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、19～27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号50に含有され、配列番号51、配列番号52、配列番号53または配列番号114のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、実施形態77～81のいずれか1つの製剤。

40

【0093】

実施形態83. SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号14、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号107または配列番号108のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態82の製剤。

【0094】

50

実施形態 83a. SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーが、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に連結された自己相補配列をさらに含み、必要に応じて、自己相補配列が、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列の 5' 末端に連結した、実施形態 83 の製剤。
【0095】

実施形態 84. SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 14、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 103、配列番号 104、配列番号 107 または配列番号 108 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、その DNA 等価物、RNA 等価物または DNA/RNA キメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0~7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 82 の製剤。

10

【0096】

実施形態 85. SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーが、検出可能な標識をさらに含む、実施形態 82~84 のいずれか 1 つの製剤。

【0097】

実施形態 86. 検出可能な標識が、蛍光または化学発光標識である、実施形態 85 の製剤。

【0098】

実施形態 87. 検出可能な標識が、蛍光標識であり、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーが、非蛍光クエンチャーをさらに含む、実施形態 86 の製剤。

20

【0099】

実施形態 88. 増量剤、界面活性剤、ヌクレオチド三リン酸、酵素、および無機塩のうちの 1 つまたは複数を含み、実施形態 77~87 のいずれか 1 つの製剤。

【0100】

実施形態 89. 乾燥組成物である、実施形態 77~88 のいずれか 1 つの製剤。

【0101】

実施形態 90. 試料中の SARS-CoV-2 核酸を増幅するための製剤であって、

(a) SARS-CoV-2 標的核酸の標的領域を増幅することができる第 1 および第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーを含む増幅用オリゴマーの組合せであって、第 1 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、第 1 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、20~23 の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号 29 に含有され、配列番号 30、配列番号 31 または配列番号 111 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、16~27 の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号 89 に含有され、配列番号 90、配列番号 112 または配列番号 113 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、増幅用オリゴマーの組合せと、

30

40

(b) 緩衝剤とを含む、製剤。

【0102】

実施形態 91. 第 1 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 15、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24 もしくは配列番号 25 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0~7 ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 16、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 79、配列番号 80、配列番号 81、配列番号 82、配

50

列番号 83 もしくは配列番号 84 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 90 の製剤。

【0103】

実施形態 92. 第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、その 5' 末端でプロモーター配列に連結されている、実施形態 90 または 91 の製剤。

【0104】

実施形態 93. プロモーター配列が、配列番号 11 と実質的に同一である、実施形態 92 の製剤。

【0105】

実施形態 94. 第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、配列番号 63、配列番号 64、配列番号 65、配列番号 66、配列番号 67、配列番号 68、配列番号 69、配列番号 70 もしくは配列番号 78 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含むかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 92 の製剤。

【0106】

実施形態 95. SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーをさらに含み、検出用プローブオリゴマーが、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、25～29 の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号 54 に含有され、配列番号 55、配列番号 56 または配列番号 115 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、実施形態 90～94 のいずれか 1 つの製剤。

【0107】

実施形態 96. SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 17、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 109 または配列番号 110 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、その DNA 等価物、RNA 等価物または DNA/RNA キメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 95 の製剤。

【0108】

実施形態 96. SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーが、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に連結された自己相補配列をさらに含み、必要に応じて、自己相補配列が、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列の 5' 末端に連結した、実施形態 96 の製剤。

【0109】

実施形態 97. SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーが、配列番号 17、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 105、配列番号 106、配列番号 109 または配列番号 110 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、その DNA 等価物、RNA 等価物または DNA/RNA キメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 95 の製剤。

【0110】

実施形態 98. SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーが、検出可能な標識をさらに含む、実施形態 95～97 のいずれか 1 つの製剤。

【0111】

実施形態 99. 検出可能な標識が、蛍光または化学発光標識である、実施形態 98 の製剤。

【0112】

10

20

30

40

50

実施形態 100. 検出可能な標識が、蛍光標識であり、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーが、非蛍光クエンチャーをさらに含む、実施形態 99 の製剤。

【0113】

実施形態 101. 増量剤、界面活性剤、ヌクレオチド三リン酸、酵素、および無機塩のうちの 1 つまたは複数をさらに含む、実施形態 90 ~ 100 のいずれか 1 つの製剤。

【0114】

実施形態 102. 乾燥組成物である、実施形態 90 ~ 101 のいずれか 1 つの製剤。

【0115】

実施形態 103. 試料中の SARS-CoV-2 を検出するための製剤であって、

(a) 緩衝剤と、

(b) 1 つまたは複数の SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーとを含み、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーが、(i) 19 ~ 27 の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号 50 に含有され、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 53 または配列番号 114 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含む、第 1 の検出用プローブオリゴマー；および (ii) 25 ~ 29 の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号 54 に含有され、配列番号 55、配列番号 56 または配列番号 115 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含む、第 1 の検出用プローブオリゴマーからなる群から選択される、製剤。

【0116】

実施形態 104. 第 1 および／または第 2 の検出用プローブオリゴマーが、配列番号 14、配列番号 17、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 107、配列番号 108、配列番号 109 または配列番号 110 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なる、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列、その DNA 等価物、RNA 等価物または DNA/RNA キメラ形などを含み、0 ~ 7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 103 の製剤。

【0117】

実施形態 105. 少なくとも 1 つの SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 14、配列番号 17、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 103、配列番号 104、配列番号 105、配列番号 106、配列番号 107、配列番号 108、配列番号 109 または配列番号 110 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、その DNA 等価物、RNA 等価物または DNA/RNA キメラ形などを含むかまたはそれからなり、0 ~ 7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 103 の製剤。

【0118】

実施形態 106. SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーが、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に連結された自己相補配列をさらに含み、必要に応じて、自己相補配列が、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列の 5' 末端に連結した、実施形態 103 または 104 の製剤。

【0119】

実施形態 107. 自己相補配列が、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブの標的

10

20

30

40

50

にハイブリダイズする配列に非ヌクレオチドリンカーによって連結されている、実施形態 106 の製剤。

【0120】

実施形態 108. SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーが、検出可能な標識をさらに含む、実施形態 103～107 のいずれか 1 つの製剤。

【0121】

実施形態 109. 検出可能な標識が、蛍光または化学発光標識である、実施形態 108 の製剤。

【0122】

実施形態 110. 検出可能な標識が、蛍光標識であり、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーが、非蛍光クエンチャーをさらに含む、実施形態 109 の製剤。

【0123】

実施形態 111. 増量剤、界面活性剤、および無機塩のうちの 1 つまたは複数をさらに含む、実施形態 103～110 のいずれか 1 つの製剤。

【0124】

実施形態 112. 乾燥組成物である、実施形態 103～111 のいずれか 1 つの製剤。

【0125】

実施形態 113. 実施形態 76、89、102 および 112 のいずれか 1 つに記載の乾燥組成物を含む、キット。

【0126】

実施形態 114. 再構成試薬をさらに含み、乾燥組成物が、キット内の第 1 のバイアルの中にあり、再構成試薬が、キット内の第 2 のバイアルの中にある、実施形態 114 のキット。

【0127】

実施形態 115. 乾燥組成物が、トレハロース、ラフィノース、マンニトール、およびこれらの組合せからなる群から選択される増量剤を含む、実施形態 113 または 114 のキット。

【0128】

実施形態 116. 乾燥組成物が、非線状界面活性剤を含む、実施形態 113～115 のいずれか 1 つのキット。

【0129】

実施形態 117. 非線状界面活性剤が、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルまたはジギトニンである、実施形態 116 のキット。

【0130】

実施形態 118. 再構成試薬が、塩化マグネシウム、塩化カリウム、およびエチルアルコールのうちの 1 つまたは複数を含む、実施形態 113～117 のいずれか 1 つのキット。

【0131】

実施形態 119. 試料中の SARS-CoV-2 の存在または非存在を決定するための水性反応混合物を調製するための方法であって、水性反応混合物を作製するために実施形態 76、89、102 または 112 のいずれか 1 つに記載の乾燥組成物を再構成試薬と混ぜ合わせるステップを含む方法。

【0132】

実施形態 120. 再構成試薬が、塩化マグネシウム、塩化カリウム、およびエチルアルコールのうちの 1 つまたは複数を含む、実施形態 119 の方法。

【0133】

実施形態 121. 混ぜ合わせるステップが、乾燥組成物用の第 1 のホルダー、再構成試薬用の第 2 のホルダー、プログラム可能なコントローラー、およびプログラム可能なコントローラーと通信している分注デバイスを含む、自動システムを使用して行われ、プログラム可能なコントローラーが、ソフトウェア命令により分注デバイスに再構成試薬のアリ

10

20

30

40

50

コートを手2のホルダー位置から手1のホルダー位置へ移させ、それによって水性反応混合物を作製するように構成される、実施形態119の方法。

【0134】

実施形態122. 試料中のSARS-CoV-2の存在または非存在を決定するための方法であって、

(a) SARS-CoV-2標的核酸を含有する、または含有する疑いがある試料を、少なくとも手1の増幅用オリゴマーの組合せおよび手2の増幅用オリゴマーの組合せと接触させるステップであって、

(i) 手1の増幅用オリゴマーの組合せが、SARS-CoV-2標的核酸の手1の標的領域を増幅することができる手1および手2のSARS-CoV-2領域1特異的増幅用オリゴマーを含み、

(1) 手1のSARS-CoV-2領域1特異的増幅用オリゴマーが、手1のSARS-CoV-2領域1に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、18~27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号26に含有され、配列番号27または配列番号28のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(2) 手2のSARS-CoV-2領域1特異的増幅用オリゴマーが、手2のSARS-CoV-2領域1に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、18~23の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号85に含有され、配列番号86、配列番号87または配列番号88のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(ii) 手2の増幅用オリゴマーの組合せが、SARS-CoV-2標的核酸の手2の標的領域を増幅することができる手1および手2のSARS-CoV-2領域2特異的増幅用オリゴマーを含み、

(1) 手1のSARS-CoV-2領域2特異的増幅用オリゴマーが、手1のSARS-CoV-2領域2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、20~23の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号29に含有され、配列番号30、配列番号31または配列番号111のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(2) 手2のSARS-CoV-2領域2特異的増幅用オリゴマーが、手2のSARS-CoV-2領域2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、16~27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号89に含有され、配列番号90、配列番号112または配列番号113のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、ステップと、

(b) 核酸増幅に好適な条件で試料をインキュベートするステップであって、任意のSARS-CoV-2標的核酸が、試料中に存在する場合、SARS-CoV-2標的核酸の手1および／または手2の標的領域に対応する1つまたは複数のアンプリコンを生成するための鋳型として使用される、ステップと、

(c) 1つまたは複数のアンプリコンの存在または非存在を検出するし、それによって試料中のSARS-CoV-2の存在または非存在を決定するステップとを含む方法。

【0135】

実施形態123. (a) (i) (1)の手1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号12、配列番号18、配列番号19、配列番号20もしくは配列番号21のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有するかまたはそれからなり、0~7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは(a) (i) (2)の手2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号13、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配

列番号 74 もしくは配列番号 75 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 122 の方法。

【0136】

実施形態 124. (a) (ii) (1) の第 1 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 15、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24 もしくは配列番号 25 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは (a) (ii) (2) の第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 16、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 79、配列番号 80、配列番号 81、配列番号 82、配列番号 83 もしくは配列番号 84 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 122 または 123 の方法。

10

【0137】

実施形態 125. (a) (i) (2) の第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、その 5' 末端でプロモーター配列に連結されている、実施形態 122～124 のいずれか 1 つの方法。

20

【0138】

実施形態 126. プロモーター配列が、配列番号 11 と実質的に同一である、実施形態 125 の方法。

【0139】

実施形態 127. (a) (i) (2) の第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、配列番号 57、配列番号 58、配列番号 59、配列番号 60、配列番号 61 もしくは配列番号 62 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含むかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 125 の方法。

30

【0140】

実施形態 128. (a) (ii) (2) の第 2 の SARS-CoV-2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、その 5' 末端でプロモーター配列に連結されている、実施形態 122～127 のいずれか 1 つの方法。

【0141】

実施形態 129. プロモーター配列が、配列番号 11 と実質的に同一である、実施形態 128 の方法。

【0142】

実施形態 130. (a) (ii) (2) の第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーが、配列番号 63、配列番号 64、配列番号 65、配列番号 66、配列番号 67、配列番号 68、配列番号 69、配列番号 70 もしくは配列番号 78 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA/RNA キメラ形を含むかまたはそれからなり、0～7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 128 の方法。

40

【0143】

実施形態 131. 検出するステップ (c) が、1 つまたは複数のアンプリコンを、存在する場合、1 つまたは複数の SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーと接触させることを含み、SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーが、(a) 19～27 の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号 50 に含有され、配列番号 5

50

1、配列番号52、配列番号53もしくは配列番号114のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含む、第1の検出用プローブオリゴマー、または(ii)25～29の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号54に含有され、配列番号55、配列番号56もしくは配列番号115のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含む、第2の検出用プローブオリゴマーからなる群から選択される、実施形態122～130のいずれか1つの方法。

【0144】

10

実施形態132. 第1および／または第2の検出用プローブオリゴマーが、配列番号14、配列番号17、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号107、配列番号108、配列番号109および配列番号110のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なる、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含み、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態131の方法。

【0145】

20

実施形態133. 1つまたは複数のSARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、配列番号14、配列番号17、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109および配列番号110、ならびにそのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形、ならびに0～7ヌクレオチドアナログを含むものからなる群から選択される配列を独立して含む、実施形態131の方法。

【0146】

30

実施形態134. SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に連結された自己相補配列をさらに含み、必要に応じて、自己相補配列が、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列の5'末端に連結した、実施形態131または132の方法。

【0147】

実施形態135. 自己相補配列が、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に非ヌクレオチドリンカーによって連結されている、実施形態134の方法。

【0148】

40

実施形態136. SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、検出可能な標識をさらに含む、実施形態131～135のいずれか1つの方法。

【0149】

実施形態137. 検出可能な標識が、蛍光または化学発光標識である、実施形態136の方法。

【0150】

実施形態138. 検出可能な標識が、蛍光標識であり、SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、非蛍光クエンチャーをさらに含む、実施形態137の方法。

【0151】

実施形態139. SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、分子ビー

50

コンまたは分子トーチである、実施形態 134～138 のいずれか 1 つの方法。

【0152】

実施形態 140. SARS-CoV-2 標的核酸が、増幅ステップ (b) の前に試料の他の成分から分離される、実施形態 122～139 のいずれか 1 つの方法。

【0153】

実施形態 141. SARS-CoV-2 標的核酸が、接触させるステップ (a) の前に試料の他の成分から分離される、実施形態 140 の方法。

【0154】

実施形態 142. 分離するステップが、SARS-CoV-2 標的核酸を固体支持体に直接または間接的に結合させること、続いて、SARS-CoV-2 標的核酸-固体支持体複合体を洗浄して試料の他の成分を除去することにより行われる、実施形態 140 または 141 の方法。

【0155】

実施形態 143. SARS-CoV-2 標的核酸が、標的捕捉用オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされ、標的捕捉用オリゴヌクレオチドが、固体支持体を直接結合する、実施形態 142 の方法。

【0156】

実施形態 144. SARS-CoV-2 標的核酸が、標的捕捉用オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされ、標的捕捉用オリゴヌクレオチドが、固体支持体に取り付けられている固定化されたプローブを直接結合する、実施形態 142 の方法。

【0157】

実施形態 145. 標的捕捉用オリゴヌクレオチドが、(i) 配列番号 97、配列番号 98、配列番号 99、配列番号 100、配列番号 101 または配列番号 102 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、その DNA 等価物、RNA 等価物または DNA/RNA キメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0～24 ヌクレオチドアナログを含む、標的にハイブリダイズする配列と、(ii) $d(T)_{0\sim3}d(A)_{14\sim30}$ である固体支持体結合領域とを含む、実施形態 143 または 144 の方法。

【0158】

実施形態 146. 標的捕捉用オリゴヌクレオチドが、配列番号 91、配列番号 92、配列番号 93、配列番号 94、配列番号 95 または配列番号 96 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる、実施形態 143～145 のいずれか 1 つの方法。

【0159】

実施形態 147. *in vitro* 核酸増幅反応が、等温増幅反応である、実施形態 122～146 のいずれか 1 つの方法。

【0160】

実施形態 148. 等温増幅反応が、転写媒介増幅 (TMA) 反応または核酸配列ベース増幅 (NASBA) 反応である、実施形態 147 の方法。

【0161】

実施形態 149. *in vitro* 核酸増幅反応が、PCR 反応ある、実施形態 122～146 のいずれか 1 つの方法。

【0162】

実施形態 150. *in vitro* 核酸増幅反応が、リアルタイム反応ある、実施形態 122～149 のいずれか 1 つの方法。

【0163】

実施形態 151. *in vitro* 核酸増幅反応が、定量的反応ある、実施形態 122～150 のいずれか 1 つの方法。

【0164】

実施形態 152. *in vitro* 核酸増幅反応が、マルチプレックス反応である、実

10

20

30

40

50

施形態 1 2 2 ~ 1 5 1 のいずれか 1 つの方法。

【0165】

実施形態 1 5 3 . 試料中の S A R S - C o V - 2 の存在または非存在を決定するための方法であって、

(a) S A R S - C o V - 2 標的核酸を含有する、または含有する疑いがある試料を、S A R S - C o V - 2 標的核酸の標的領域を増幅することができる第 1 および第 2 の S A R S - C o V - 2 特異的増幅用オリゴマーを含む増幅用オリゴマーの組合せと接触させるステップであって、

(i) 第 1 の S A R S - C o V - 2 特異的増幅用オリゴマーが、第 1 の S A R S - C o V - 2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、18 ~ 27 の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号 26 に含有され、配列番号 27 または配列番号 28 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(i i) 第 2 の S A R S - C o V - 2 特異的増幅用オリゴマーが、第 2 の S A R S - C o V - 2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、18 ~ 23 の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号 85 に含有され、配列番号 86、配列番号 87、または配列番号 88 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、

ステップと、

(b) 核酸増幅に好適な条件下で試料をインキュベートするステップであって、任意の S A R S - C o V - 2 標的核酸が、試料中に存在する場合、S A R S - C o V - 2 標的核酸の標的領域に対応するアンプリコンを生成するための鋳型として使用される、ステップと、

(c) アンプリコンの存在または非存在を検出し、それによって試料中の S A R S - C o V - 2 の存在または非存在を決定するステップとを含む方法。

【0166】

実施形態 1 5 4 . 第 1 の S A R S - C o V - 2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 12、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20 もしくは配列番号 21 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA / RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0 ~ 7 ヌクレオチドアナログを含み、ならびに / あるいは第 2 の S A R S - C o V - 2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号 13、配列番号 71、配列番号 72、配列番号 73、配列番号 74 もしくは配列番号 75 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA / RNA キメラ形を含有するかまたはそれからなり、0 ~ 7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 1 5 3 の方法。

【0167】

実施形態 1 5 5 . 第 2 の S A R S - C o V - 2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、その 5' 末端でプロモーター配列に連結されている、実施形態 1 5 3 または 1 5 4 の方法。

【0168】

実施形態 1 5 6 . プロモーター配列が、配列番号 11 と実質的に同一である、実施形態 1 5 5 の方法。

【0169】

実施形態 1 5 7 . 第 2 の S A R S - C o V - 2 特異的増幅用オリゴマーが、配列番号 57、配列番号 58、配列番号 59、配列番号 60、配列番号 61 もしくは配列番号 62 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA / RNA キメラ形を含むかまたはそれからなり、0 ~ 7 ヌクレオチドアナログを含む、実施形態 1 5 5 の方法。

【0170】

実施形態158. 検出するステップ(c)が、アンプリコンを、存在する場合、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含むSARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーと接触させることを含み、この標的にハイブリダイズする配列が、19~27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号50に含有され、配列番号51、配列番号52、配列番号53または配列番号114のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、実施形態153~157のいずれか1つの方法。

【0171】

実施形態159. SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号14、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号107または配列番号108のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0~7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態158の方法。

10

【0172】

実施形態160. SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号14、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号103、配列番号104、配列番号107または配列番号108のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0~7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態158の方法。

20

【0173】

実施形態161. SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に連結された自己相補配列をさらに含み、必要に応じて、自己相補配列が、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列の5'末端に連結した、実施形態158または159の方法。

30

【0174】

実施形態162. 自己相補配列が、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に非ヌクレオチドリンカーによって連結されている、実施形態161の方法。

【0175】

実施形態163. SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、検出可能な標識をさらに含む、実施形態158~162のいずれか1つの方法。

【0176】

実施形態164. 検出可能な標識が、蛍光または化学発光標識である、実施形態163の方法。

40

【0177】

実施形態165. 検出可能な標識が、蛍光標識であり、SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、非蛍光クエンチャーをさらに含む、実施形態164の方法。

【0178】

実施形態166. SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、分子ビーコンまたは分子トーチである、実施形態164の方法。

【0179】

実施形態167. SARS-CoV-2標的核酸が、増幅ステップ(b)の前に試料の他の成分から分離される、実施形態153~166のいずれか1つの方法。

【0180】

50

実施形態 168. SARS-CoV-2 標的核酸が、接触させるステップ (a) の前に試料の他の成分から分離される、実施形態 167 の方法。

【0181】

実施形態 169. 分離するステップが、SARS-CoV-2 標的核酸を固体支持体に直接または間接的に結合させること、続いて、SARS-CoV-2 標的核酸-固体支持体複合体を洗浄して試料の他の成分を除去することにより行われる、実施形態 167 または 168 の方法。

【0182】

実施形態 170. SARS-CoV-2 標的核酸が、標的捕捉用オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされ、標的捕捉用オリゴヌクレオチドが、固体支持体を直接結合する、実施形態 169 の方法。

【0183】

実施形態 171. SARS-CoV-2 標的核酸が、標的捕捉用オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされ、標的捕捉用オリゴヌクレオチドが、固体支持体に取り付けられている固定化されたプローブを直接結合する、実施形態 169 の方法。

【0184】

実施形態 172. 標的捕捉用オリゴヌクレオチドが、(i) 配列番号 97、配列番号 98、配列番号 99、配列番号 100、配列番号 101 または配列番号 102 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、その DNA 等価物、RNA 等価物または DNA/RNA キメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0~24 ヌクレオチドアナログを含む、標的にハイブリダイズする配列と、(ii) d(T)_{0~3}d(A)_{14~30} である固体支持体結合領域とを含む、実施形態 170 または 171 の方法。

【0185】

実施形態 173. 標的捕捉用オリゴヌクレオチドが、配列番号 91、配列番号 92、配列番号 93、配列番号 94、配列番号 95 または配列番号 96 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有するかまたはそれからなる配列を含む、実施形態 170~172 のいずれか 1 つの方法。

【0186】

実施形態 174. *in vitro* 核酸増幅反応が、等温増幅反応である、実施形態 153~173 のいずれか 1 つの方法。

【0187】

実施形態 175. 等温増幅反応が、TMA 反応または NASBA 反応である、実施形態 174 の方法。

【0188】

実施形態 176. *in vitro* 核酸増幅反応が、PCR 反応ある、実施形態 153~173 のいずれか 1 つの方法。

【0189】

実施形態 177. *in vitro* 核酸増幅反応が、定量的反応ある、実施形態 153~176 のいずれか 1 つの方法。

【0190】

実施形態 178. *in vitro* 核酸増幅反応が、リアルタイム反応ある、実施形態 153~177 のいずれか 1 つの方法。

【0191】

実施形態 179. 試料中の SARS-CoV-2 の存在または非存在を決定するための方法であって、

(a) SARS-CoV-2 標的核酸を含有する、または含有する疑いがある試料を、SARS-CoV-2 標的核酸の標的領域を増幅することができる第 1 および第 2 の SARS-CoV-2 特異的増幅用オリゴマーを含む増幅用オリゴマーの組合せと接触させるステップであって、

10

20

30

40

50

(i) 第1のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、20～23の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号29に含有され、配列番号30、配列番号31、または配列番号111のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、

(ii) 第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列が、16～27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号89に含有され、配列番号90、配列番号112、または配列番号113のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、
ステップと、

(b) 核酸増幅に好適な条件下で試料をインキュベートするステップであって、任意のSARS-CoV-2標的核酸が、試料中に存在する場合、SARS-CoV-2標的核酸の標的領域に対応するアンプリコンを生成するための鋳型として使用される、ステップと、

(c) アンプリコンの存在または非存在を検出し、それによって試料中のSARS-CoV-2の存在または非存在を決定するステップとを含む方法。

【0192】

実施形態180. 第1のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号15、配列番号22、配列番号23、配列番号24もしくは配列番号25のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含み、ならびに／あるいは第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、配列番号16、配列番号76、配列番号77、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83もしくは配列番号84のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態179の方法。

【0193】

実施形態181. 第2のSARS-CoV-2に特異的な標的にハイブリダイズする配列が、その5'末端でプロモーター配列に連結されている、実施形態179または180の方法。

【0194】

実施形態182. プロモーター配列が、配列番号11と実質的に同一である、実施形態181の方法。

【0195】

実施形態183. 第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーが、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70もしくは配列番号78のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なる連続するヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含むかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態181の方法。

【0196】

実施形態184. 検出するステップ(c)が、アンプリコンを、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列を含むSARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーと接触させることを含み、この標的にハイブリダイズする配列が、25～29の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号54に含有され、配列番号55、配列番号56または配列番号115のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、

10

20

30

40

50

3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する、実施形態179～183のいずれか1つの方法。

【0197】

実施形態185. SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号17、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号109または配列番号110のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態184の方法。

【0198】

実施形態186. SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーの標的にハイブリダイズする配列が、配列番号17、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号105、配列番号106、配列番号109または配列番号110のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0～7ヌクレオチドアナログを含む、実施形態184の方法。

【0199】

実施形態187. SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に連結された自己相補配列をさらに含み、必要に応じて、自己相補配列が、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列の5'末端に連結した、実施形態184または185の方法。

【0200】

実施形態188. 自己相補配列が、SARS-CoV-2特異的検出用プローブの標的にハイブリダイズする配列に非ヌクレオチドリンカーによって連結されている、実施形態187の方法。

【0201】

実施形態189. SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、検出可能な標識をさらに含む、実施形態184～188のいずれか1つの方法。

【0202】

実施形態190. 検出可能な標識が、蛍光または化学発光標識である、実施形態189の方法。

【0203】

実施形態191. 検出可能な標識が、蛍光標識であり、SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、非蛍光クエンチャーをさらに含む、実施形態190の方法。

【0204】

実施形態192. SARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーが、分子ビーコンまたは分子トーチである、実施形態190の方法。

【0205】

実施形態193. SARS-CoV-2標的核酸が、増幅ステップ(b)の前に試料の他の成分から分離される、実施形態179～192のいずれか1つの方法。

【0206】

実施形態194. SARS-CoV-2標的核酸が、接触させるステップ(a)の前に試料の他の成分から分離される、実施形態193の方法。

【0207】

実施形態195. 分離するステップが、SARS-CoV-2標的核酸を固体支持体に直接または間接的に結合させること、続いて、SARS-CoV-2標的核酸-固体支持体複合体を洗浄して試料の他の成分を除去することにより行われる、実施形態193または194の方法。

10

20

30

40

50

【0208】

実施形態196. SARS-CoV-2 標的核酸が、標的捕捉用オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされ、標的捕捉用オリゴヌクレオチドが、固体支持体を直接結合する、実施形態195の方法。

【0209】

実施形態197. SARS-CoV-2 標的核酸が、標的捕捉用オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされ、標的捕捉用オリゴヌクレオチドが、固体支持体に取り付けられている固定化されたプローブを直接結合する、実施形態195の方法。

【0210】

実施形態198. 標的捕捉用オリゴヌクレオチドが、(i) 配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101または配列番号102のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、そのDNA等価物、RNA等価物またはDNA/RNAキメラ形などを含有するかまたはそれからなり、0~24ヌクレオチドアナログを含む、標的にハイブリダイズする配列と、(ii) d(T)_{0~3}d(A)_{14~30}である固体支持体結合領域とを含む、実施形態196または197の方法。

【0211】

実施形態199. 標的捕捉用オリゴヌクレオチドが、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95または配列番号96のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる、実施形態196~198のいずれか1つの方法。

【0212】

実施形態200. *in vitro* 核酸増幅反応が、等温増幅反応である、実施形態179~199のいずれか1つの方法。

【0213】

実施形態201. 等温増幅反応が、TMA反応またはNASBA反応である、実施形態200の方法。

【0214】

実施形態202. *in vitro* 核酸増幅反応が、PCR反応ある、実施形態179~199のいずれか1つの方法。

【0215】

実施形態203. *in vitro* 核酸増幅反応が、定量的反応ある、実施形態179~202のいずれか1つの方法。

【0216】

実施形態204. *in vitro* 核酸増幅反応が、リアルタイム反応ある、実施形態179~203のいずれか1つの方法。

【0217】

実施形態205. 試料中のSARS-CoV-2および少なくとも1つの他の病原体の存在または非存在を決定するためのマルチプレックス方法であって、SARS-CoV-2の存在または非存在が、実施形態153~178のいずれか1つの方法を使用して決定される、マルチプレックス方法。

【0218】

実施形態206. 試料中のSARS-CoV-2および少なくとも1つの呼吸器病原体の存在または非存在を決定する、実施形態205のマルチプレックス方法。

【0219】

実施形態207. SARS-CoV-2、ならびにインフルエンザA型、インフルエンザB型、呼吸器合胞体ウイルスA型、呼吸器合胞体ウイルスB型、パラインフルエンザウイルス1型、パラインフルエンザウイルス2型、パラインフルエンザウイルス3型、パラインフルエンザウイルス4型、アデノウイルス、メタニューモウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス229E型、コロナウイルスNL63型、コロナウイルスHKU1型、

10

20

30

40

50

コロナウイルスOC43型、SARS-CoV (SARS)、およびMERS-CoVからなる群から選択される1つまたは複数の病原体の、存在または非存在を決定する、実施形態205のマルチプレックス方法。

【0220】

実施形態208. 試料中のSARS-CoV-2および少なくとも1つの他の病原体の存在または非存在を決定するためのマルチプレックス方法であって、SARS-CoV-2の存在または非存在が、実施形態179~204のいずれか1つの方法を使用して決定される、マルチプレックス方法。

【0221】

実施形態209. 試料中のSARS-CoV-2および少なくとも1つの呼吸器病原体の存在または非存在を決定する、実施形態208のマルチプレックス方法。

【0222】

実施形態210. SARS-CoV-2、ならびにインフルエンザウイルスA型、インフルエンザウイルスB型、呼吸器合胞体ウイルスA型、呼吸器合胞体ウイルスB型、パラインフルエンザウイルス1型、パラインフルエンザウイルス2型、パラインフルエンザウイルス3型、パラインフルエンザウイルス4型、アデノウイルス、メタニューモウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス229E型、コロナウイルスNL63型、コロナウイルスHKU1型、コロナウイルスOC43型、SARS-CoV (SARS)、およびMERS-CoVからなる群から選択される1つまたは複数の病原体の、存在または非存在を決定する、実施形態208のマルチプレックス方法。

【0223】

実施形態211. 試料中のSARS-CoV-2および少なくとも1つの他の病原体の存在または非存在を決定するためのマルチプレックス方法であって、SARS-CoV-2の存在または非存在が、実施形態122~152のいずれか1つの方法を使用して決定される、マルチプレックス方法。

【0224】

実施形態212. 試料中のSARS-CoV-2および少なくとも1つの呼吸器病原体の存在または非存在を決定する、実施形態211のマルチプレックス方法。

【0225】

実施形態213. SARS-CoV-2、ならびにインフルエンザA型、インフルエンザB型、呼吸器合胞体ウイルスA型、呼吸器合胞体ウイルスB型、パラインフルエンザウイルス1型、パラインフルエンザウイルス2型、パラインフルエンザウイルス3型、パラインフルエンザウイルス4型、アデノウイルス、メタニューモウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス229E型、コロナウイルスNL63型、コロナウイルスHKU1型、コロナウイルスOC43型、SARS-CoV (SARS)、およびMERS-CoVからなる群から選択される1つまたは複数の病原体の、存在または非存在を決定する、実施形態211のマルチプレックス方法。

【0226】

実施形態214. 試料が、プール試料である、実施形態122~223のいずれか1つの方法。

【0227】

これらおよび他の態様および実施形態は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照することによって明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0228】

図1および2は、SARS-CoV-2生物の増幅および検出用のプライマーとプローブ(PPR)の混合物の成績を示す直線性プロットである。

【0229】

【図1】図1は、表1に示されるようなSARS-CoV-2 PPRミックス1およびSARS-CoV-2 PPRミックス5の各々を含有する、混ぜ合わせられたPPRミ

10

20

30

40

50

ックスを使用する、*in vitro*転写物（*IVT*）の希釈物に対する反応についての直線性データを示す。下記の実施例2を参照されたい。

【0230】

【図2】図2は、同じ混ぜ合わせられたPPRミックスを使用する、特定のウイルス株の希釈物に対する反応についての直線性データを示す。下記の実施例3を参照されたい。

【発明を実施するための形態】

【0231】

定義

別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての専門および科学用語は、記載される方法および組成物に関する技術分野の当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。本明細書で使用される場合、以下の用語および句は、別段の指定がない限り、それらに帰する意味を有する。

【0232】

用語「1つの（*a*）」、「1つの（*an*）」および「その（*the*）」は、文脈による別段の明確な指示がない限り、複数の言及対象を含む。例えば、「核酸（*nucleic acid*）」は、本明細書で使用される場合、1つまたは複数の核酸を表すと解される。しかるが故に、用語「1つの（*a*）」（または「1つの（*an*）」）、「1つまたは複数の（*one or more*）」および「少なくとも1つの（*at least one*）」は、本書では同義で使用され得る。

【0233】

値が、「約」*X*または「おおよそ」*X*と表現されている場合、*X*の述べられている値は、±10%の精度である解されることになる。

【0234】

全ての範囲は、「終点を含まない」などの明確な除外がない場合は終点を包含すると解釈されることとし、したがって、例えば、「10～15以内」は、値10および15を含む。述べられている範囲が、端の値の間の整数および差し支えなければ範囲内の有理数と同様に、端の値を含む（例えば、範囲5～10は、5、6、7、8、9および10、ならびに差し支えなければ、6.8、9.35などのような値を含む）ことは、当業者には理解されるであろう。

【0235】

「試料」は、COVID-19の原因となるコロナウイルス、例えばSARS-CoV-2を、その成分、例えば、核酸、または核酸の断片を含めて、含有する、または含有する疑いがある、任意の検体を含む。試料は、生きているまたは死んだ哺乳動物（例えば、ヒト）または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。生体試料は、鼻咽頭スワブ、鼻腔スワブ、中鼻甲介スワブ、中咽頭スワブ、咽頭スワブ、鼻洗浄液、気管支洗浄液、鼻吸引液、痰、血液、血漿、血清、血液細胞、唾液、粘液（*mucous*）、呼吸器組織、滲出物（例えば、気管支肺胞洗浄液）、痰、気管吸引液、リンパ節、胃腸組織、糞便、尿、泌尿生殖器液、および生検細胞または組織を含むが、これらに限定されない。試料を試料調製により処理または加工することができる。試料は、個別試料（すなわち、単一の対象に由来する試料）であることも、プール試料（すなわち、複数の個別試料をプールすることにより調製された試料）であることもある。

【0236】

「試料調製」は、増幅および／または検出用の試料を調製するために必要とされる任意のステップまたは方法を指す。試料を、組織、細胞、または細胞成分を化学的に、物理的におよび／または機械的に破壊するように処理して、分析用の生体試料を調製するために使用される酵素、緩衝剤、塩、界面活性物質などをさらに含有し得る水溶液または有機溶液に細胞内の成分を放出させることができる。試料を化学的に、物理的に、および／または機械的に処理して、細胞成分または破壊片を除去することもできる。試料に濾過デバイス上もしくは中を通過させることにより、遠心分離、または媒体、マトリックスもしくは支持体への付着により、試料を加工することができる。試料調製は、ポリヌクレオチドな

10

20

30

40

50

どの成分をより大きい試料体積から濃縮するための、例えば、より大きい体積の試料からの濾過による、遠心分離、または標準的な微生物学法を使用することにより試料から微生物を単離することによる方法を含む。試料調製は、標的核酸を特異的に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ためのポリヌクレオチドの使用も含み得る。

【0237】

用語「標的捕捉」は、試料混合物の他の成分、例えば、細胞断片、細胞小器官、タンパク質、脂質、炭水化物、または他の核酸から、標的核酸を選択的に分離または単離することを指す。標的捕捉系は、特異的であり得、所定の標的核酸を他の試料成分から（例えば、所期の標的核酸に特異的な配列、例えばTCO TS配列を使用することにより）選択的に分離することができる。標的捕捉方法および組成物は、以前に詳細に記載されている（米国特許第6,110,678号および同第6,534,273号、ならびに米国特許出願公開第2008/0286775A1号）。一部の実施形態では、標的捕捉は、溶液相中のTCOと支持体に取り付けられている固定化された捕捉プローブとを利用して、標的核酸と複合体を形成し、捕捉された標的を他の成分から分離する。

10

【0238】

「標的捕捉用オリゴヌクレオチド」（TCO）は、標準的な塩基対合により標的核酸中の配列に特異的にハイブリダイズし、固定化されたプローブ上の結合パートナーに連結して標的核酸を支持体に捕捉する、核酸オリゴヌクレオチドである。TCOを使用して、標的核酸を試料から捕捉または単離することができる。TCOは、標的核酸の領域にハイブリダイズする（すなわち、相補的である）標的特異的（TS）ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、TCO TS配列は、標的核酸中に存在するヌクレオチド配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、または100%相補性を有し、標的核酸配列中の領域（TCO結合部位）にハイブリダイズする、10~35ヌクレオチド配列を含む。TCOは、固定化された捕捉用プローブに（例えば、特異的結合対相互作用により）結合する、固定化された捕捉用プローブ結合領域を含む。一部の実施形態では、TCO TS配列は、捕捉用プローブ結合領域に連結されている。一部の実施形態では、TCO TS配列、および捕捉用プローブ結合領域は、1つまたは複数のリンカーにより共に連結された2つの異なるオリゴヌクレオチド上に存在する。一部の実施形態では、捕捉用プローブ結合領域は、ポリA配列、ポリT配列、またはポリT-ポリA配列を含む。一部の実施形態では、ポリT-ポリA配列は、(dT)_{0~3}(dA)_{14~30}または(dT)₃(dA)₃₀を含む。

20

30

【0239】

「固定化された捕捉用プローブ」は、TCOを固体支持体に連結するための手段を提供する。一部の実施形態では、固定化された捕捉用プローブは、結合された標的ポリヌクレオチドの未結合材料からの分離を助長する、固体支持体に連結された塩基配列認識分子を含有する。溶液中の遊離しているマトリックスおよび粒子などの、任意の公知の固体支持体を使用してもよい。例えば、固体支持体は、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、および磁力で引き付けられる粒子であり得る。一部の実施形態では、支持体は、単分散である（すなわち、サイズが±約5%で均一である）磁性球を含む。固定化された捕捉用プローブは、固体支持体に直接（例えば、共有結合的連結またはイオン相互作用によって）、または間接的に連結され得る。有用な固体支持体の一般的な例としては、磁性粒子またはビーズが挙げられる。

40

【0240】

「ヌクレオチド」は、リン酸基と五炭糖と窒素含有塩基とからなる核酸のサブユニット（本明細書では「核酸塩基」とも呼ばれる）である。RNA中に見られる五炭糖は、リボースである。DNAでは、五炭糖は、2'-デオキシリボースである。

【0241】

「核酸」および「ポリヌクレオチド」は、互いに連結されて生体高分子を形成するヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む、多量体化合物を指す。生体高分子

50

は、通常のRNA、通常のDNA、混合RNA-DNA、およびこれらのヌクレオチドアナログ含有バージョンを含む。核酸「骨格」は、糖-ホスホジエステル連結、ペプチド-核酸結合（「ペプチド核酸」、またはPNA）、ホスホロチオエート連結、メチルホスホネート連結、またはこれらの組合せのうちの1つまたは複数を含む、様々な連結で構成され得る。核酸の糖部分は、リボース、デオキシリボース、または置換もしくは改変を有する類似の化合物、例えば、リボースの2'位にメトキシ、フルオロもしくはハロゲン化物基を有するアナログ（本明細書では、「2'-O-Me」もしくは「2'-メトキシ」、もしくは2'-フルオロ、もしくは「2'-ハロゲン化物」とも呼ばれる）であり得る。窒素含有塩基は、通常、塩基であるアデニン（A）、ウラシル（U）、グアニン（G）、チミン（T）およびシトシン（C）、ならびにこれらのアナログ（例えば、イノシン、5-メチル-2'-デオキシシトシン（deoxycytosine）（「5-Me-dC」または「5MeC」）、プロビン dU、およびイソグアニン）であり得る。核酸は、1つまたは複数の「脱塩基」残基を含むことがあり、この場合、主鎖は、ポリマーの（単数または複数の）位置に窒素含有塩基を含まない。

10

【0242】

配列同一性は、デフォルトギャップパラメーターを使用して、アルゴリズム、例えば、Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0（Genetics Computer Group、575 Science Dr., Madison, Wis.）におけるBESTFIT、FASTAおよびTFASTAを使用して、配列のアラインすることにより、または点検、およびベストアラインメント（すなわち、比較ウィンドウにわたって配列類似性の最高パーセンテージを生じさせる結果となるアラインメント）により、決定することができる。配列同一性のパーセンテージは、2つの最適にアラインされた配列を比較ウィンドウにわたって比較すること、同一の残基が両方の配列中出现する位置の数を決定して、マッチした位置の数を得ること、マッチした位置の数を、比較ウィンドウ内のギャップを数に入れないマッチした位置とミスマッチ位置の合計数（すなわち、ウィンドウサイズ）で割ること、そして結果に100を掛けて、配列同一性のパーセンテージを得ることにより、算出される。別段の指示がない限り、2配列間の比較ウィンドウは、2つの配列のうちの短いほうの全長により定義される。

20

【0243】

用語「相補性」は、ポリヌクレオチドの、旧来のワトソン-クリック塩基対合または他の非旧来型の塩基対合のどちらかによって別のポリヌクレオチド配列と水素結合を形成する（ハイブリダイズする）能力を指す。2本の相補ポリヌクレオチド鎖は、互いに逆平行である。相補性パーセントは、第2の核酸配列と水素結合（例えば、ワトソン-クリック塩基対合）を形成することができる第1の核酸配列中の、連続した鎖内の、塩基のパーセンテージを示す（例えば、10個のうちの5個、6個、7個、8個、9個、10個は、50%、60%、70%、80%、90%および100%相補的となる）。相補性パーセントは、同一性パーセントと同様のやり方で算出される。

30

【0244】

「RNA等価物」および「DNA等価物」とは、本質的に同じ核酸配列または相補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（すなわち、リボース対デオキシリボース）を有し、RNA中にウラシルおよびDNA中にチミンが存在する点で異なり得る。RNA等価物とDNA等価物の相違は、等価物が特定の配列に対して同じ相補性度を有するので、相同性の相違の一因にならない。「DNA/RNAキメラ形」とは、DNAヌクレオチドとRNAヌクレオチドの両方を含む核酸を意味する。文脈による別段の明確な指示がない限り、コロナウイルスの核酸への言及は、RNAおよびDNA等価物、ならびにそれらのDNA/RNAキメラ形を含む。

40

【0245】

「オリゴマー」、「オリゴヌクレオチド」、または「オリゴ」は、一般に1,000ヌ

50

クレオチド (n t) 未満の核酸を指し、これには、約 5 n t の下限および約 900 n t の上限を有するサイズ範囲のものが含まれる。一部の実施形態では、オリゴマーは、5 ~ 15 n t の下限および 50 ~ 500 n t の上限を有するサイズ範囲である。一部の実施形態では、オリゴマーは、10 ~ 100 核酸塩基、10 ~ 90 核酸塩基、10 ~ 80 核酸塩基、10 ~ 70 核酸塩基、または 10 ~ 60 核酸塩基のサイズ範囲である。オリゴヌクレオチドは、DNA および／もしくは RNA ならびに／またはそのアナログであり得る。用語オリゴヌクレオチドは、試薬に対する任意の特定の機能を示すのではなく、本明細書に記載されるそのような試薬の全てを網羅するように一般的に使用される。オリゴマーは、機能名（例えば、捕捉用プローブ、プライマー、またはプロモータープライマー）により言及され得るが、そのような用語がオリゴマーを指すことは当業者には理解されるであろう。RNA ポリメラーゼプロモーター含有オリゴマー（プロモータープライマー、例えば、T7 プライマーとも称される）、非 RNA ポリメラーゼプロモーター含有オリゴマー（非 T7 プライマー、NT7 プライマー、または非プロモータープライマーとも称される）、プローブオリゴマー（検出用オリゴマーまたは検出用プローブ、プローブ、またはトーチとも称される）、標的捕捉用オリゴヌクレオチド (TCO)、フォワードプライマー（非 T7 プライマーまたは NT7 プライマー）、およびリバースプライマー（T7 プライマーを含む）を含む、オリゴマーが、記載される。オリゴマーを、任意の周知 *in vitro* 化学的または酵素的方法を使用して合成的に作製することができ、合成後、標準的な方法、例えば、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用することにより精製することができる。

10

20

【0246】

記載されるオリゴヌクレオチドのいずれも、少なくとも 1 つの改変ヌクレオチド（すなわち、少なくとも 1 つのヌクレオチドアナログ）を含有し得る。改変ヌクレオチドは、2'-O-メチル改変ヌクレオチド、2'-フルオロ改変ヌクレオチド、または 5'-メチルシトシンであり得るが、これらに限定されない。一部の実施形態では、増幅用オリゴヌクレオチドは、2 つまたはそれより多くの改変ヌクレオチドを含む。2 つまたはそれより多くの改変ヌクレオチドは、同じであることも、異なることもある。一部の実施形態では、チミジンヌクレオチドでウリジンヌクレオチドを置換することができる。一部の実施形態では、全てのチミジンヌクレオチドでウリジンヌクレオチドを置換することができる。一部の実施形態では、5'-メチル-2'-デオキシシトシン塩基を使用して、オリゴヌクレオチドに組み込まれた 5'-メチル-2'-デオキシシトシンごとに Tm を約 0.5 ° ~ 1.3 °C 上昇させることにより（対応するメチル化されていない増幅用オリゴヌクレオチドと比べて）二重鎖の安定性を増大させることができる。

30

【0247】

「標的核酸」は、増幅および／または検出すべき標的配列を含む核酸である。標的核酸は、DNA または RNA であり得、一本鎖または二本鎖であり得る。標的核酸は、ゲノム核酸および転写された核酸、例えば mRNA であり得るが、これらに限定されない。一本鎖標的核酸、例えば、一本鎖 RNA ウイルスまたは mRNA の場合、標的核酸は、その相補物を含む。標的核酸は、ゲノム核酸または転写された核酸に由来する、核酸であることもある。標的核酸（適宜、その相補物を含む）は、標的核酸を増幅および／または検出するために使用される、捕捉用オリゴヌクレオチド、プライマー、および／またはプローブにハイブリダイズする配列を含有する。標的核酸は、標的核酸に加えて、増幅されないこともある他の配列を含み得る。

40

【0248】

「標的配列」または「標的核酸配列」は、増幅および／または検出すべき、標的核酸の特定のヌクレオチド配列である。その相補物を含む標的配列は、増幅プロセス（例えば、PCR、TMA）中に標的核酸を増幅および／または検出するために使用されるプライマーおよびプローブにハイブリダイズする配列を含有する。文脈による別段の明確な指示がない限り、標的核酸が元々一本鎖である場合、用語「標的配列」は、「標的配列」に相補的な配列も、標的核酸中に存在する場合には指すことになり、標的核酸が元々二本鎖であ

50

る場合、用語「標的配列」は、センス（＋）鎖とアンチセンス（－）鎖の両方を指す。

【0249】

「標的にハイブリダイズする配列」、「標的にハイブリダイズする領域」、または「標的特異的配列」は、標的核酸配列中の領域にハイブリダイズする、オリゴマー中の配列である。標的にハイブリダイズする領域は、標的核酸配列中のヌクレオチドの連続する相補配列にハイブリダイズする、ヌクレオチドの連続する配列である。標的にハイブリダイズする配列は、標的核酸と特異的にハイブリダイズするように構成されている。標的にハイブリダイズする配列は、標的核酸と特異的にハイブリダイズするように構成されている。標的にハイブリダイズする配列は、ハイブリダイズするように構成されている標的核酸配列の部分に100%相補的であり得るが、必ずしもそうとは限らない。標的にハイブリダイズする配列は、標的にハイブリダイズする配列が標的核酸と特異的にハイブリダイズすることを条件に、標的配列と比べて挿入、欠失および／または置換ヌクレオチド残基も含み得る。プライマーまたはプローブは、標的特異的配列と非標的特異的配列の両方を含有し得る。標的特異的配列（または標的にハイブリダイズする配列もしくは標的にハイブリダイズする領域）は、標的核酸とハイブリダイズするように構成されている、オリゴヌクレオチドの部分である。配列番号Xからなる、標的にハイブリダイズする配列を含む、オリゴヌクレオチド（例えば、プライマーまたはプローブ）への言及は、標的核酸に相補的であるオリゴヌクレオチドの部分が、示されている配列番号のみからなることを示す。オリゴヌクレオチドは、他の標的にハイブリダイズしない配列または他の成分（例えば、標識）を含有することもあるが、標的にハイブリダイズする配列は、示されている配列番号の配列からなる。

10

20

【0250】

「非標的特異的配列」または「標的にハイブリダイズしない配列」は、オリゴマー配列の領域であって、標準的なハイブリダイゼーション条件下で標的配列と安定的にハイブリダイズしない領域を指す。非標的特異的配列を有するオリゴマーとしては、プロモータープライマー、プロモーター提供体、標的捕捉用オリゴヌクレオチド、トーチ、および分子ビーコンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0251】

「配列を標的とする」は、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オリゴヌクレオチドが標的配列にハイブリダイズする、SARS-CoV-2核酸の領域に関して使用される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、標的とされるSARS-CoV-2核酸配列と相補的であり、ミスマッチを含有しない。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、標的とされるSARS-CoV-2核酸配列と相補的であるが、1、2、3、4または5つのミスマッチを含有する。

30

【0252】

用語「するように構成されている」は、言及されるオリゴヌクレオチドの標的にハイブリダイズする配列のポリヌクレオチド配列構成の実際の配置を示す。例えば、指定されたアンプリコンを標的配列から生成するように構成されている増幅用オリゴマーは、標的核酸にハイブリダイズし、かつアンプリコンを生成するために増幅反応で使用され得るポリヌクレオチド配列を有する。また、一例として、標的配列に特異的にハイブリダイズするように構成されているオリゴヌクレオチドは、言及される配列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特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチド配列を有する。

40

【0253】

用語「に特異的にハイブリダイズするように構成されている」は、増幅用オリゴヌクレオチド、検出用プローブ、または他のオリゴヌクレオチドの、標的にハイブリダイズする領域が、言及されるSARS-CoV-2標的配列の配列を標的とすることができるポリヌクレオチド配列を有するように設計されていることを示す。オリゴヌクレオチドは、試料中のSARS-CoV-2標的核酸の増幅および／または検出のためのアッセイの成分として機能するように設計されており、したがって、検査する試料に一般に見られる他の

50

核酸の存在下でSARS-CoV-2を標的とするように設計されている。「に特異的にハイブリダイズする」は、当技術分野において理解されているように、非標的核酸への何らかの小さなレベルのハイブリダイゼーションが起こる可能性があるもので、に排他的にハイブリダイズするという意味ではない。もっと正確に言えば、「に特異的にハイブリダイズする」は、試料中の標的核酸の正確な増幅および／または検出を行うことができるように、オリゴヌクレオチドが主として標的をハイブリダイズするようにアッセイにおいて機能するように構成されていることを意味する。

【0254】

「増幅用オリゴヌクレオチド」、「増幅用オリゴマー」、または「プライマー」は、標的核酸にハイブリダイズし、核酸増幅反応に参加する、例えば、プライマーとしての役割を果たす、オリゴヌクレオチドである。増幅用オリゴマーは、核酸増幅反応の一部としての重合により伸長される3'末端を有し得る。あるいは、増幅用オリゴマーは、重合により伸長されるのではなく核酸増幅を助長する成分、例えば、増幅用オリゴマーの標的にハイブリダイズする配列の5'に連結されたプロモーター配列を提供する、3'末端を有し得る。そのような増幅用オリゴマーは、プロモーター提供体と呼ばれる。重合により伸長可能である3'の標的にハイブリダイズする領域と5'プロモーター配列の両方を提供する増幅用オリゴマーは、プロモータープライマーと呼ばれる。増幅用オリゴマーを、5'の標的にハイブリダイズしない領域、例えば、タグ、プロモーター（述べたような）、またはプライマーもしくは標的オリゴヌクレオチドを操作もしくは増幅するために使用されるもしくはは有用な他の配列を含むように、必要に応じて改変することができる。

【0255】

「核酸増幅」は、標的核酸配列、もしくはその相補配列、またはそれらの断片（すなわち、完全に満たない標的核酸を含有する増幅された配列）の、複数のコピーを生じさせる任意のin vitro手順を指す。核酸増幅手順の例としては、転写関連方法、例えば、転写媒介増幅（TMA）、核酸配列ベース増幅（NASBA）など（例えば、米国特許第5,399,491号、同第5,554,516号、同第5,437,990号、同第5,130,238号、同第4,868,105号、および同第5,124,246号）、およびポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（例えば、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、および同第4,800,159号）が挙げられる。

【0256】

「転写媒介増幅」は、核酸鋳型から複数のRNA転写物を生じさせるために、DNAポリメラーゼ（例えば、逆転写酵素）、RNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオシド三リン酸、リボヌクレオシド三リン酸、プライマー（プロモータープライマーを含む）を使用し、必要に応じて、他のオリゴヌクレオチドを含み得る（Kacianらの米国特許第5,399,491号および同第5,554,516号、Burgらの米国特許第5,437,990号、GingerasらのPCT番号WO88/01302および同WO88/10315、Malekらの米国特許第5,130,238号、Urdeaらの米国特許第4,868,105号および同第5,124,246号、McDonoughらのPCT番号WO94/03472、ならびにRyderらのPCT番号WO95/03430に詳細に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる）。TMAを使用する方法は、以前に詳細に記載されている（米国特許第5,399,491号および同第5,554,516号、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる）。TMAは、実質的に等温の増幅であり得る。TMAを二相増幅反応として実行することもできる。

【0257】

用語「実質的に等温の増幅」は、実質的に一定した温度で行われる増幅反応を指す。反応の等温部分には様々な温度での1つまたは複数のステップ例えば、最初に変性ステップ、そして最後に熱不活性化ステップまたは冷却ステップが先行するまたは続く。この定義が、温度の小さな変動を排除するのではなく等温増幅技法を、増幅された産物を生成するために「温度を循環させること」に基本的に頼る当技術分野において公知の他の増幅技法

と差別化するために使用されることは、理解されるであろう。

【0258】

「アンプリコン」または「増幅産物」は、核酸増幅反応において生成され、標的核酸に由来する（標的核酸から増幅される）核酸分子である。アンプリコンまたは増幅産物は、標的核酸と同じ方向のものでも反対の方向のものであってもよい標的核酸配列を含有する。

【0259】

「相対蛍光単位」（「RFU」）は、蛍光強度の測定単位である。RFUは、測定に使用される検出手段の特徴によって異なり、試料と対照との間の相対強度を比較するための測定値として使用され得る。

【0260】

「検出用プローブオリゴマー」、「検出用プローブ」、または「プローブ」は、標的核酸の検出のための、核酸ハイブリダイゼーションを促進する条件下で増幅された産物を含む標的配列に特異的にハイブリダイズする、オリゴマーである。検出は、直接的（すなわち、標的に直接ハイブリダイズされるプローブ）、または間接的（すなわち、標的にプローブを連結する中間構造にハイブリダイズされるプローブ）のいずれかであり得る。プローブの標的配列は、プローブが特異的にハイブリダイズする、より大きい配列内の特定の配列を一般に指す。検出用プローブは、標的特異的配列、および非標的特異的配列を含み得る。そのような非標的特異的配列は、検出および／または増幅を助長するために使用され得る、所望の二次または三次構造、例えば、ヘアピン構造を付与することになる、配列を含み得る。プローブは、検出可能な標識を有することができる。検出可能な標的をプローブに直接または間接的に連結することができる。

【0261】

「分子トーチ」または「トーチ」は、ある種のプローブであり、アンプリコンが試料中に存在するかどうかを示すために使用することができる。分子トーチは、明確に異なる自己相補性領域を含む。標的に曝露されたとき、分子トーチの（完全にまたは部分的に相補的な）2つの自己相補領域が融解し、その結果として、個々のヌクレオチド（標的結合ドメインを含む）が、標的核酸配列上の相補的な連続するヌクレオチドにハイブリダイズすることが可能になる。分子トーチは、標的結合ドメインが標的閉鎖ドメイン（自己相補性領域）よりも標的核酸配列へのハイブリダイゼーションに有利に働くように、設計される。分子トーチの標的結合ドメインおよび標的閉鎖ドメインは、相互作用標識（例えば、蛍光色素およびクエンチャー、FRET対）を含み、その結果、分子トーチを標的核酸配列にハイブリダイズしたときとは対照的に、分子トーチが自己ハイブリダイズしたときに異なるシグナルが生成される（それによって、ハイブリダイズされていないプローブの存在下での検査試料中のプローブ：標的三重鎖の検出が可能になる）。標識を合成する、標識を核酸に取り付ける、および標識からのシグナルを検出する方法は、当技術分野において周知である（例えば、Sambrook et al., supra, at 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、ならびに欧州特許出願第0747706号）。

【0262】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」、または「ストリンジェントな条件」は、オリゴマーが標的配列に優先的にハイブリダイズすることおよび近縁の非標的核酸に由来する核酸にはそうしないことを可能にする条件（すなわち、標的核酸の増幅および／または検出を可能にするが、標的とされない生物の増幅および／または検出を可能にしないために、オリゴマーがその標的配列に、安定したオリゴマー：標的ハイブリッドを形成するが、十分な数の安定したオリゴマー：非標的ハイブリッドを形成しないように、ハイブリダイズすることを可能にする条件）である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の定義は、変わらないが、ストリンジェントなハイブリダイゼーションに使用され得る実際の反応環境は、オリゴマーのGC含量および長さ、オリゴマー配列と検査

10

20

30

40

50

試料中に存在し得る非標的核酸の配列との類似性度、および標的配列をはじめとする、因子に応じて変わり得る。ハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーション試薬または溶液の温度および組成を含む。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、当業者によって容易に突き止められる。

【0263】

「標識」または「検出可能な標識」は、検出される、または検出可能なシグナルをもたらす、プローブに直接もしくは間接的に連結された部分または化合物である。直接的な連結は、共有結合または非共有結合性の相互作用（例えば、水素結合、疎水性またはイオン相互作用、およびキレートまたは配位錯体形成）を使用し得るが、間接的な連結は、架橋部分またはリンカーを使用し得る（例えば、検出可能なシグナルを増幅する、抗体または追加のオリゴヌクレオチドを介する。任意の検出可能な部分、例えば、放射性核種、リガンド、例えばビオチンまたはアビジン、酵素、酵素基質、反応性基、発色団、例えば検出可能な色を付与する色素または粒子（例えば、ラテックスまたは金属ビーズ）、発光化合物（例えば、生物発光、リン光、または化学発光化合物、例えば、アクリジニウムエステル（「AE」）化合物）、および蛍光化合物（すなわち、フルオロフォア）を、使用することができる。フルオロフォアは、フルオロフォアにごく近接しているときにフルオロフォアにより放射される光を吸収するクエンチャー分子と組み合わせて使用され得る。検出可能に標識されたプローブとしては、TaqMan（商標）プローブ、AE標識プローブ、分子トーチ、および分子ビーコンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0264】

「クエンチャー」は、光を吸収する分子である。クエンチャーは、フルオロフォアにごく近接しているときに放射光を吸収するために、フルオロフォアなどの発光標識と組み合わせて一般に使用される。クエンチャーは、当技術分野において周知であり、2～3例を挙げると、Black Hole Quencher（商標）（またはBHQ（商標）、BHQ-1（商標）、もしくはBHQ-2（商標））、Blackberry Quencher、Dabcyl、QSY、およびTamra（商標）化合物が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0265】

「非伸長性」オリゴマーは、その3'末端にまたはその付近に伸長を防止するためのブロッキング部分を含む。3'末端付近のブロッキング基は、一部の実施形態では、3'末端の5残基以内にあり、オリゴマーへのポリメラーゼの結合を制限するのに十分な大きさである。他の実施形態では、ブロッキング基は、3'末端に共有結合で取り付けられている。好適なブロッキング基としては、例えば、アルキル基、非ヌクレオチドリナー、アルカンジオールジデオキシヌクレオチド残基、コルジセピン、3'-デオキシヌクレオチド、3'-リン酸化ヌクレオチド、逆方向ヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、および標識、例えばフルオロフォアまたはクエンチャーが挙げられる。

30

【0266】

「配列番号Xの配列」への言及は、生体高分子を形成するように互いに連結されている核酸塩基、ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログの配列を指す。配列番号による配列への言及は、文脈による別段の明確な指示がない限り、主鎖（例えば、RNA、2'-O-Me RNA、またはDNA）の同一性も、いずれの核酸塩基改変（例えば、シトシン残基のメチル化（「5MeC」））も含意しない。一部の事例では、配列番号の配列の後に「[x～y]ヌクレオチドアナログを含む」という記述が続く。ヌクレオチドアナログは、配列番号の配列内の置換、配列番号への付加、または両方であり得ると理解されたい。文脈による別段の明確な指示がない限り、配列番号による配列への言及は、その相補配列への言及を含む（例えば、配列5'-ttagc-3'への言及は、配列5'-gctaa-3'への言及を含む）。

40

【0267】

「分離すること」または「精製すること」は、1つもしくは複数の成分、または混合物、例えば試料の、混合物中の1つまたは複数の他の成分からの除去を指す。試料成分は、

50

標的核酸をはじめとする核酸、細胞断片、タンパク質、炭水化物、脂質、および他の化合物を含む。分離することまたは精製することは、いずれの精製度も含意しない。一部の実施形態では、標的核酸または増幅された産物の少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%が、混合物中の他の成分から分離または除去される。

【0268】

増幅および／または検出系の文脈での「特異性」は、配列およびアッセイ条件に依存して標的配列と非標的配列とを区別するその能力を記述する、系の特徴を指す。核酸増幅に関して、特異性は、一般に、産生される特定のアンプリコンの数の副産物の数に対する比（例えば、シグナル対ノイズ比）を指す。検出に関して、特異性は、一般に、標的核酸から生じるシグナルの非標的核酸から生じるシグナルに対する比を指す。

10

【0269】

「感度」は、核酸増幅反応を検出または定量することができる精度を指す。増幅反応の感度は、一般に、増幅系において容易に検出され得る標的核酸の最小コピー数の測度であり、例えば、用いられている検出アッセイ、および増幅反応の特異性、例えば、特定のアンプリコンの副産物に対する比に依存する。

詳細な説明

【0270】

試料からSARS-CoV-2核酸を増幅および／または検出するための、組成物（増幅用オリゴマーの組合せを含む）、キット、製剤および方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、試料は、生体試料である。組成物、キット、および方法は、SARS-CoV-2のORF1ab遺伝子配列を標的とするオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド配列、またはそれらの相補配列を提供する。記載されるオリゴヌクレオチドは、増幅用オリゴヌクレオチドを含み、増幅用オリゴヌクレオチドは、プライマー、プロモータープライマー、ブロックされたオリゴヌクレオチド、およびプロモーター提供体オリゴヌクレオチドを含むことができ、これらの機能は、以前に記載されている（例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、同第4,800,159号、同第5,399,491号、同第5,554,516号、同第5,824,518号、および同第7,374,885号を参照されたい）。記載されるオリゴヌクレオチドは、SARS-CoV-2の増幅された配列を検出するためのプローブ、およびSARS-CoV-2標的核酸の捕捉のための標的捕捉用オリゴヌクレオチドも含む。

20

30

【0271】

方法は、SARS-CoV-2核酸の高感度かつ特異的な検出を提供する。方法は、SARS-CoV-2標的領域の核酸増幅を行うステップ、および増幅された産物を、例えば、増幅された産物を試料中のSARS-CoV-2の存在を示すシグナルを提供する核酸検出用プローブと特異的にハイブリダイズすることにより、検出するステップを含む。増幅ステップは、試料をSARS-CoV-2標的核酸中の標的配列に特異的な1つまたは複数の増幅用オリゴマーと接触させて、SARS-CoV-2核酸が試料中に存在する場合に増幅された産物を生じさせることを含む。増幅は、少なくとも1つの核酸ポリマーゼおよび少なくとも1つの増幅用オリゴマーを使用することにより標的配列またはその相補物の追加のコピーを合成して、鋳型鎖からコピーを（例えば、鋳型鎖を使用して配列をプライマーから伸長することにより）生じさせる。一部の実施形態では、増幅された産物を検出するステップは、増幅された産物を、選択された増幅用オリゴマーにより増幅される配列、例えば、増幅用オリゴマーがハイブリダイズする標的配列および両側に位置する標的配列に含有される配列に特異的な、少なくとも1つの検出用プローブオリゴマーと、接触させることを含むハイブリダイズするステップを含む。

40

【0272】

SARS-CoV-2を増幅および検出するための、増幅用オリゴマーの組合せおよびプローブが、記載される。一部の実施形態では、増幅用オリゴマーの組合せは、標的核酸

50

配列を増幅するために構成された少なくとも2つのプライマーを含む。一部の実施形態では、増幅用オリゴマーの組合せは、第1のプライマー（例えば、NT7プライマーまたはフォワードプライマー）および第2のプライマー（例えば、プロモータープライマーまたはT7プライマーまたはリバースプライマー）を含む。標的核酸に対して、少なくとも1つのプライマーが、標的にハイブリダイズする配列をセンス配向で含み、少なくとも1つのプライマーが、標的にハイブリダイズする配列をアンチセンス配向で含むことは、当業者には理解されるであろう。プライマーは、アンチセンスプライマーがセンスプライマーの下流に位置し、センスプライマーがアンチセンスプライマーの下流に位置するように、構成される（すなわち、少なくとも2つのプライマーは、それらが、増幅すべき標的領域の両側に位置し、他方のプライマーの方向での重合をプライミングし、それによって2つのプライマー間の領域を増幅するように構成される）。一部の実施形態では、SARS-CoV-2の少なくとも2つの領域を増幅および検出するための増幅用オリゴマーの組合せおよび対応するプローブを含む、組成物、製剤、反応混合物およびキットが、記載される。

10

【0273】

本開示による増幅および／または検出方法は、方法の後続のステップに供するための試料を得るステップをさらに含み得る。一部の実施形態では、使用されることになる試料を「得ること」は、例えば、方法の1つもしくは複数のステップが行われる検査施設もしくは他の場所で試料を受け取ること、および／または方法の1つもしくは複数のステップが行われる施設内の場所から（例えば、保管場所もしくは他の受託所から）試料を回収することを含む。

20

【0274】

一部の実施形態では、組成物、製剤、キットおよび方法は、増幅すべき標的領域の両側に位置する少なくとも2つの増幅用オリゴマーを利用する *in vitro* 増幅反応での SARS-CoV-2 標的配列の指数関数的増幅を提供する。増幅反応は、循環型であることも、等温性であることもある。

【0275】

一部の態様では、組成物は、1つまたは複数の非 SARS-CoV-2 病原体への交差反応性が最小である SARS-CoV-2 核酸に特異的にハイブリダイズするように構成される。一部の態様では、組成物は、表5（下記の実施例4を参照されたい）に記載される1つまたは複数の非 SARS-CoV-2 病原体への交差反応性が最小である SARS-CoV-2 核酸に特異的にハイブリダイズするように構成される。他の相互排他的でない態様では、組成物は、OC43、HKU1、NL63および229Eから選択される1つまたは複数のコロナウイルス病原体への交差反応性が最小である SARS-CoV-2 核酸に特異的にハイブリダイズするように構成される。一部の態様では、組成物は、SARS-CoV-2 でない、1つまたは複数の病原体（例えば、1つまたは複数の非 SARS-CoV-2 病原体、例えば、表5に記載される病原体の1つまたは複数など）を検出するための成分および方法をさらに含むマルチプレックス系の一部である。

30

【0276】

一部の態様では、本明細書に記載のオリゴマーまたはオリゴマーの組合せを利用するための方法が提供される。本明細書で開示される任意の方法は、方法の目的に関する方法に参与する材料の対応する使用の開示とさらに解されたい。本明細書で開示される任意の方法はまた、方法で使用されるオリゴヌクレオチドおよび組成物の開示であると解される。SARS-CoV-2 の標的にハイブリダイズする配列を含むオリゴマーのいずれか、およびそのようなオリゴマーを含む任意の組合せ（例えば、キットおよび組成物）は、SARS-CoV-2 を検出または定量化することにおける使用のために、および SARS-CoV-2 を検出または定量化するための組成物の調製における使用のために、開示されるとさらに解されたい。

40

【0277】

大まかに言えば、方法は、次の構成要素のうちの1つまたは複数を含み得る： SARS

50

ーC o Vー2 核酸（例えば、臨床試料などの試料からのもの）が、存在する場合、標的捕捉用オリゴヌクレオチドにアニールされる、標的捕捉；標的捕捉用オリゴヌクレオチドと会合していない材料を除去するための単離、例えば、洗浄；増幅；および増幅とリアルタイムで行われ得るアンプリコン検出、例えば、アンプリコン定量化。一部の実施形態では、方法は、前述のステップの各々を含む。一部の実施形態では、増幅は、指数関数的増幅を、必要に応じて、先行する線形増幅ステップとともに含む（例えば、二相増幅）。一部の実施形態では、増幅は、指数関数的増幅およびアンプリコン検出を含む。一部の実施形態では、方法は、上に列挙されている構成要素のいずれか2つを含む。一部の実施形態では、方法は、上に隣接して列挙されている任意の2つの構成要素、例えば、洗浄および増幅、または増幅および検出を含む。

10

【0278】

一部の実施形態では、SARS-C o Vー2 標的配列を増幅するステップは、増幅すべき標的領域の両側に位置する少なくとも2つの増幅用オリゴマーを使用する *in vitro* 増幅反応を利用する。SARS-C o Vー2 標的領域の増幅に特に好適なオリゴマーの組合せが本明細書に記載される。一部の実施形態では、オリゴマーの組合せは、配列番号1の約1141ヌクレオチド位～約1235ヌクレオチド位の領域に対応するSARS-C o Vー2 標的核酸の第1の標的領域を増幅するための少なくとも2つの増幅用オリゴマーを含む。SARS-C o Vー2 標的核酸の第1の標的領域を増幅するための少なくとも2つの増幅用オリゴマーは、第1のSARS-C o Vー2 特異的増幅用オリゴマー、および第2の第1のSARS-C o Vー2 特異的増幅用オリゴマーを含み得る。一部の実施形態では、第1のSARS-C o Vー2 特異的増幅用オリゴマーは、第1のSARS-C o Vー2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列は、18～27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号26に含有され、配列番号27または配列番号28のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、第2のSARS-C o Vー2 特異的増幅用オリゴマーは、第2のSARS-C o Vー2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列は、18～23の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号85に含有され、配列番号86、配列番号87または配列番号88のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する。一部の実施形態では、オリゴマーの組合せは、配列番号1の約4642ヌクレオチド位～約4744ヌクレオチド位の領域に対応するSARS-C o Vー2 標的核酸の第2の標的領域を増幅するための少なくとも2つの増幅用オリゴマーを含む。SARS-C o Vー2 標的核酸の第2の標的領域を増幅するための最小限2つの増幅用オリゴマーは、第1のSARS-C o Vー2 特異的増幅用オリゴマー、および第2の第1のSARS-C o Vー2 特異的増幅用オリゴマーを含み得る。一部のそのような実施形態では、第1のSARS-C o Vー2 特異的増幅用オリゴマーは、第1のSARS-C o Vー2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列は、20～23の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号29に含有され、配列番号30、配列番号31または配列番号111のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有し、第2のSARS-C o Vー2 特異的増幅用オリゴマーは、第2のSARS-C o Vー2 に特異的な標的にハイブリダイズする配列を含み、この標的にハイブリダイズする配列は、16～27の連続するヌクレオチドの長さであり、配列番号89に含有され、配列番号90、配列番号112または配列番号113のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列を含有する。一部の実施形態では、第1のSARS-C o Vー2 標的領域と第2のSARS-C o Vー2 標的領域の両方が、マルチプレックス形式で増幅される。一部の実施形態では、第1のSARS-C o Vー2 標的領域と第2のSARS-C o Vー2 標的領域の一方または両方、および内部対照標的領域が、マルチプレックス形式で増幅される。第1および／または第2のSARS-C o Vー2 標的領域を増幅するための例示的な増幅用オリゴマーは、下記の表39に記載され、第1および第2の標的領域の各

20

30

40

50

々のための第1および第2の増幅用オリゴマーの特定の組合せは、本明細書中で示される（上記の実施形態セクション、および下記の実施例2～13を参照されたい）。

SARS-CoV-2 領域1プライマーおよびプローブ
【0279】

一部の実施形態では、第1のSARS-CoV-2 領域1 特異的プライマー（増幅用オリゴマー、例えば、フォワードプライマー、非T7プライマー、またはNT7プライマー）は、18～27 核酸塩基の長さの、標的にハイブリダイズする領域を含み、標的にハイブリダイズする領域は、配列番号26またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形に含有され、配列番号27もしくは28のヌクレオチド配列またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有する。一部の実施形態では、第1のSARS-CoV-2 領域1 特異的プライマーは、18～27 核酸塩基の長さの、標的にハイブリダイズする領域を含み、標的にハイブリダイズする領域は、配列番号26またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形に含有され、配列番号27もしくは28のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有する。一部の実施形態では、第1のSARS-CoV-2 領域1 特異的プライマーは、配列番号12、18、19、20もしくは21のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。一部の実施形態では、第1のSARS-CoV-2 領域1 特異的プライマーは、配列番号12、18、19、20もしくは21のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形から本質的になる。一部の実施形態では、第1のSARS-CoV-2 領域1 特異的プライマーは、配列番号12、18、19、20もしくは21のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形からなる。一部の実施形態では、第1のSARS-CoV-2 領域1 特異的プライマーは、配列番号12、18、19、20もしくは21のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5つのミスマッチを有するヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。一部の実施形態では、第1のSARS-CoV-2 領域1 特異的プライマーは、配列番号12、18、19、20もしくは21のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有するヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。第1のSARS-CoV-2 領域1 特異的プライマーは、1つまたは複数の改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを有し得る。一部の実施形態では、第1のSARS-CoV-2 領域1 特異的プライマーは、NT7プライマーである。

【0280】

一部の実施形態では、第2のSARS-CoV-2 領域1 特異的プライマー（リバープライマー、プロモータープライマーまたはT7プライマー）は、18～23 核酸塩基の長さの、標的にハイブリダイズする領域を含み、標的にハイブリダイズする領域は、配列番号85またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形に含有され、配列番号86、87もしくは88のヌクレオチド配列またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有する。一部の実施形態では、第2のSARS-CoV-2 領域1 特異的プライマーは、18～23 核酸塩基の長さの、標的にハイブリダイズする領域を含み、標的にハイブリダイズする領域は、配列番号85またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形に含有され、配列番号86、87、88のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有する。一部の実施形態では、第2のSARS-CoV-2 領域1 特異的プライマーは、配列番号13、71、72、73、74または75のヌクレオチド配列、そのRNA等価物またはDNA/RNAキメラ形を含む。一部の実施形態では、第2のSARS-CoV-2 領域1 特異的プライマーは、配列番号13、71、72、73、74もしくは75のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形から本質的になる。一部の実施形態では、第2のSARS-

C o V - 2 領域 1 特異的プライマーは、配列番号 13、71、72、73、74 もしくは 75 のヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA / RNA キメラ形からなる。一部の実施形態では、第 2 の S A R S - C o V - 2 領域 1 特異的プライマーは、配列番号 13、71、72、73、74 もしくは 75 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 つのミスマッチを有するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA / RNA キメラ形を含む。一部の実施形態では、第 2 の S A R S - C o V - 2 領域 1 特異的プライマーは、配列番号 13、71、72、73、74 もしくは 75 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の相同性を有するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA / RNA キメラ形を含む。第 2 の S A R S - C o V - 2 領域 1 特異的プライマーは、1 つまたは複数の改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを有し得る。一部の実施形態では、2 つの異なる第 2 の S A R S - C o V - 2 領域 1 プライマーが T M A 反応で使用される。

10

【0281】

一部の実施形態では、第 2 の S A R S - C o V - 2 領域 1 プライマーは、S A R S - C o V - 2 領域 1 プロモータープライマーを含む。一部の実施形態では、S A R S - C o V - 2 領域 1 プロモータープライマーは、配列番号 57、58、59、60、61 もしくは 62 のヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA / RNA キメラ形を含む。一部の実施形態では、S A R S - C o V - 2 領域 1 プロモータープライマーは、配列番号 57、58、59、60、61 もしくは 62 のヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA / RNA キメラ形から本質的になる。一部の実施形態では、S A R S - C o V - 2 領域 1 プロモータープライマーは、配列番号 57、58、59、60、61 もしくは 62 のヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA / RNA キメラ形からなる。一部の実施形態では、S A R S - C o V - 2 領域 1 プロモータープライマーは、配列番号 57、58、59、60、61 もしくは 62 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 つのミスマッチを有するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA / RNA キメラ形を含む。一部の実施形態では、S A R S - C o V - 2 領域 1 プロモータープライマーは、配列番号 57、58、59、60、61 もしくは 62 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の相同性を有するヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物もしくは DNA / RNA キメラ形を含む。S A R S - C o V - 2 領域 1 プロモータープライマーは、1 つまたは複数の改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを有し得る。一部の実施形態では、2 つの異なる S A R S - C o V - 2 領域 1 プロモータープライマーが T M A 反応で使用される。

20

30

【0282】

一部の実施形態では、S A R S - C o V - 2 領域 1 プローブは、19 ~ 27 核酸塩基の長さの、標的にハイブリダイズする領域を含み、標的にハイブリダイズする領域は、配列番号 50 またはその RNA 等価物、DNA / RNA キメラ形、および / もしくは相補物に含有され、配列番号 51、52、53 もしくは 114 のヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物、DNA / RNA キメラ形、および / もしくは相補物を含有する。一部の実施形態では、S A R S - C o V - 2 領域 1 プローブは、19 ~ 27 核酸塩基の長さの、標的にハイブリダイズする領域を含み、標的にハイブリダイズする領域は、配列番号 50 またはその RNA 等価物、DNA / RNA キメラ形、および / もしくは相補物に含有され、配列番号 51、52、53 もしくは 114 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはその RNA 等価物、DNA / RNA キメラ形、および / もしくは相補物を含有する。一部の実施形態では、S A R S - C o V - 2 領域 1 プローブは、配列番号 14、32 ~ 41、103、104、107 または 108 のヌクレオチド配列、あるいはその DNA もしくは RNA 等価物、DNA / RNA キメラ形、および / または相補物を含む。一部の実施形態では、S A R S - C o V - 2 領域 1 プローブは、配列番号 14、32 ~ 41、103、104、107 または 108 のヌ

40

50

クレオチド配列、あるいはそのDNAもしくはRNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および／または相補物から本質的になる。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域1プローブは、配列番号14、32～41、103、104、107または108のヌクレオチド配列、あるいはそのDNAもしくはRNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および／または相補物からなる。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域1プローブは、配列番号14、32～41、103、104、107または108のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5つのミスマッチを有するヌクレオチド配列、あるいはそのDNAもしくはRNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および／または相補物を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域1プローブは、配列番号14、32～41、103、104、107または108のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%の相同性を有するヌクレオチド配列、あるいはそのDNAもしくはRNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および／または相補物を含む。SARS-CoV-2領域1プローブは、1つまたは複数の改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを有し得る。

10

【0283】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域1プローブは、SARS-CoV-2領域1トーチを含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域1トーチは、配列番号103もしくは104のヌクレオチド配列、またはそのDNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および／もしくは相補物を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域1トーチは、配列番号103もしくは104のヌクレオチド配列、またはそのDNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および／もしくは相補物から本質的になる。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域1トーチは、配列番号103もしくは104のヌクレオチド配列、またはそのDNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および／もしくは相補物からなる。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域1トーチは、配列番号103もしくは104のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5つのミスマッチを有するヌクレオチド配列、またはそのDNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および／もしくは相補物を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域1トーチは、配列番号103もしくは104のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有するヌクレオチド配列、またはそのDNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および／もしくは相補物を含む。SARS-CoV-2領域1トーチは、1つまたは複数の改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを有し得る。

20

30

【0284】

SARS-CoV-2の第1の増幅用オリゴマーの組合せは、上記の少なくとも1つの第1のプライマーおよび少なくとも1つの第2のプライマーを含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域1の第1の増幅用オリゴマーの組合せは、少なくとも1つの第1のプライマーおよび少なくとも2つの異なる第2のプライマーを含む。

SARS-CoV-2領域2プライマーおよびプローブ

【0285】

一部の実施形態では、第1のSARS-CoV-2領域2特異的プライマー（（増幅用オリゴマー、例えば、フォワードプライマー、非T7プライマー、またはNT7プライマー））は、20～23核酸塩基の長さの、標的にハイブリダイズする領域を含み、標的にハイブリダイズする領域は、配列番号29またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形に含有され、配列番号30、31もしくは111のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有する。一部の実施形態では、第1のSARS-CoV-2領域2特異的プライマーは、20～23核酸塩基の長さの、標的にハイブリダイズする領域を含み、標的にハイブリダイズする領域は、配列番号29またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形に含有され、配列番号30、31もしくは111のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含

40

50

有する。一部の実施形態では、第1のSARS-CoV-2領域2特異的プライマーは、配列番号15、22、23、24もしくは25のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。一部の実施形態では、第1のSARS-CoV-2領域2特異的プライマーは、配列番号15、22、23、24もしくは25のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形から本質的になる。一部の実施形態では、第1のSARS-CoV-2領域2特異的プライマーは、配列番号15、22、23、24もしくは25のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5つのミスマッチを有するヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。一部の実施形態では、第1のSARS-CoV-2領域2特異的プライマーは、配列番号15、22、23、24もしくは25のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有するヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。第1のSARS-CoV-2領域2特異的プライマーは、1つまたは複数の改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを有し得る。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域2の第1のプライマーは、NT7プライマーである。

10

【0286】

一部の実施形態では、第2のSARS-CoV-2領域2特異的プライマー（リバープライマー、プロモータープライマーまたはT7プライマー）は、16～27核酸塩基の長さの、標的にハイブリダイズする領域を含み、標的にハイブリダイズする領域は、配列番号89またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形に含有され、配列番号90、1112もしくは113のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有する。一部の実施形態では、第2のSARS-CoV-2領域2特異的プライマーは、16～27核酸塩基の長さの、標的にハイブリダイズする領域を含み、標的にハイブリダイズする領域は、配列番号89またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形に含有され、配列番号90、1112もしくは113のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含有する。一部の実施形態では、第2のSARS-CoV-2領域2特異的プライマーは、配列番号16、76、77、79、80、81、82、83もしくは84のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。一部の実施形態では、第2のSARS-CoV-2領域2特異的プライマーは、配列番号16、76、77、79、80、81、82、83もしくは84のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形から本質的になる。一部の実施形態では、第2のSARS-CoV-2領域2特異的プライマーは、配列番号16、76、77、79、80、81、82、83もしくは84のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形からなる。一部の実施形態では、第2のSARS-CoV-2領域2特異的プライマーは、配列番号16、76、77、79、80、81、82、83もしくは84のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5つのミスマッチを有するヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。一部の実施形態では、第2のSARS-CoV-2領域2特異的プライマーは、配列番号16、76、77、79、80、81、82、83もしくは84のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有するヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。第2のSARS-CoV-2領域2特異的プライマーは、1つまたは複数の改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを有し得る。一部の実施形態では、2つの異なる第2のSARS-CoV-2領域2特異的プライマーがTMA反応で使用される。

20

30

40

【0287】

50

一部の実施形態では、第2のSARS-CoV-2領域2特異的プライマーは、SARS-CoV-2領域2プロモータープライマーを含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域2プロモータープライマーは、配列番号63、64、65、66、67、68、69、70もしくは78のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域2プロモータープライマーは、配列番号63、64、65、66、67、68、69、70もしくは78のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形から本質的になる。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域2プロモータープライマーは、配列番号63、64、65、66、67、68、69、70もしくは78のヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形からなる。一部の
10 実施形態では、SARS-CoV-2領域2プロモータープライマーは、配列番号63、64、65、66、67、68、69、70もしくは78のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5つのミスマッチを有するヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域2プロモータープライマーは、配列番号63、64、65、66、67、68、69、70もしくは78のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有するヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。SARS-CoV-2領域2プロモータープライマーは、1つまたは複数の改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを有し得る。一部の実施形態では、2つの異なるSARS-CoV-2領域
20 2プロモータープライマーがTMA反応で使用される。

【0288】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域2プローブは、25～29核酸塩基の長さの、標的にハイブリダイズする領域を含み、標的にハイブリダイズする領域は、配列番号54またはそのRNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および/もしくは相補物に含有され、配列番号55、56もしくは115のヌクレオチド配列、またはそのDNA等
30 価物、DNA/RNAキメラ形、および/もしくは相補物を含有する。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域2プローブは、25～29核酸塩基の長さの、標的にハイブリダイズする領域を含み、標的にハイブリダイズする領域は、配列番号54またはそのRNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および/もしくは相補物に含有され、配列番号55、56もしくは115のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列、またはそのRNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および/もしくは相補物を含有する。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域2プローブは、配列番号17、43～48、105、106、109または110のヌクレオチド配列、あるいはそのDNAもしくはRNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および/または相補物を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域2プローブは、配列番号17、43～48、105、106、109または110のヌクレオチド配列、あるいはそのDNAもしくはRNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および/または相補物から本質的になる。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域2プローブは、配列番号17、43～48、105、106、109または110のヌクレオチド配列、あるいはそのDNAもしくはRNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および/または相補物からなる。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域2プローブは、配列
40 番号17、43～48、105、106、109または110のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4または5つのミスマッチを有するヌクレオチド配列、あるいはそのDNAもしくはRNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および/または相補物を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2領域2プローブは、配列番号17、43～48、105、106、109または110のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%の相同性を有するヌクレオチド配列、あるいはそのDNAもしくはRNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および/または相補物を含む。SARS-CoV-2領域2プローブは、1つまたは複数の改
50

変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを有し得る。

【0289】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 領域 2 プローブは、SARS-CoV-2 領域 2 トーチを含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 領域 2 トーチは、配列番号 105 もしくは 106 のヌクレオチド配列、またはその DNA 等価物、DNA/RNA キメラ形、および／もしくは相補物を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 領域 2 トーチは、配列番号 105 もしくは 106 のヌクレオチド配列、またはその DNA 等価物、DNA/RNA キメラ形、および／もしくは相補物から本質的になる。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 領域 2 トーチは、配列番号 105 もしくは 106 のヌクレオチド配列、またはその DNA 等価物、DNA/RNA キメラ形、および／もしくは相補物からなる。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 領域 2 トーチは、配列番号 105 もしくは 106 のヌクレオチド配列と最大で 0、1、2、3、4 もしくは 5 つのミスマッチを有するヌクレオチド配列、またはその DNA 等価物、DNA/RNA キメラ形、および／もしくは相補物を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 領域 2 トーチは、配列番号 105 もしくは 106 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の相同性を有するヌクレオチド配列、またはその DNA 等価物、DNA/RNA キメラ形、および／もしくは相補物を含む。SARS-CoV-2 領域 2 トーチは、1 つまたは複数の改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを有し得る。

【0290】

SARS-CoV-2 領域 2 のプライマーセットは、上記の少なくとも 1 つの第 1 のプライマーおよび少なくとも 1 つの第 2 のプライマーを含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 領域 2 のプライマーセットは、少なくとも 1 つの第 1 のプライマーおよび少なくとも 2 つの異なる第 2 のプライマーを含む。

【0291】

一部の実施形態では、方法は、試料中の SARS-CoV-2 標的核酸を他の成分から精製するステップを、例えば、増幅の前に、例えば、捕捉ステップの前に、それと同時に、またはその後、さらに含む。そのような精製は、試料に含有される生物を他の試料成分から分離および／もしくは濃縮する方法、または非核酸試料成分、例えば、タンパク質、炭水化物、塩、脂質などを除去もしくは分解する方法を含み得る。特定の実施形態では、標的核酸は、特異的にまたは非特異的に捕捉され、他の試料成分から分離される。非特異的標的捕捉方法は、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、または SARS-CoV-2 核酸と他の試料成分とを含有する混合物から核酸を物理的に分離する他の手段を含み得る。

【0292】

標的捕捉は、ハイブリダイシング条件下で SARS-CoV-2 標的配列にハイブリダイズする 1 つまたは複数の標的捕捉用オリゴヌクレオチド (TCO) を含有する溶液相混合物中で概して行われる。一部の実施形態では、TCO は、固定化された捕捉用プローブ結合領域を含み、固定化された捕捉用プローブ結合領域を有する TCO を含む一部の実施形態では、SARS-CoV-2 標的：TCO 複合体は、固定化された捕捉用プローブ結合領域が、固定化されたプローブにハイブリダイズするように、ハイブリダイゼーション条件を調整することによって、捕捉される。一部の実施形態では、固定化されたプローブは、常磁性ビーズなどの粒子状固体支持体に結合される。選択的および非選択的標的捕捉方法は、例えば、米国特許第 6,110,678 号および国際特許出願公開番号 WO 2008/016988 (各々、参照により本明細書に組み込まれる) にも記載されている。例示的な SARS-CoV-2 特異的標的捕捉用オリゴヌクレオチドは、下記の表 39 に収載され、さらに、上記の実施形態セクション、ならびに下記の実施例 10 および 11 で示される。

【0293】

捕捉の後に単離を行うことができ、そこで、例えば、固体支持体上の複合体が他の試料

成分から分離される。単離を、任意の適切な技法、例えば、SARS-CoV-2 標的配列と会合している支持体を1回または複数回（例えば、2回または3回）洗浄して他の試料成分および／または未結合オリゴマーを除去することにより、果たすことができる。粒子状固体支持体、例えば、常磁性ビーズを使用する実施形態では、SARS-CoV-2 標的と会合している粒子を洗浄溶液に懸濁させ、洗浄溶液から、一部の実施形態では磁気引力を使用することにより、回収することができる。取り扱うステップの数を制限するために、支持体上の複合体中の標的配列を増幅用オリゴマーと単に混合すること、そして増幅ステップを進めることにより、SARS-CoV-2 標的核酸を増幅してもよい。

【0294】

試料調製は、複数の試料をプールして単一のプールバッチにすることも含み得る。好ましくは、プールすることについては、各試料のアリコートがプールされてより大きいバッチになる。プール試料のより大きいバッチは、複数の試料からのものであり得、この複数の試料は、2～約200の個別試料である。

10

SARS-CoV-2 標的捕捉用オリゴヌクレオチド

【0295】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 標的捕捉用オリゴヌクレオチドは、21～24 核酸塩基の長さの、標的にハイブリダイズする領域を含み、標的にハイブリダイズする領域は、配列番号97、98、99、100、101もしくは104のヌクレオチド配列、またはそのDNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および／もしくは相補物を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 標的捕捉用オリゴヌクレオチドは、21～24 核酸塩基の長さの、標的にハイブリダイズする領域を含み、標的にハイブリダイズする領域は、配列番号97、98、99、100、101もしくは104のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5ヌクレオチド異なるヌクレオチド配列またはそのDNA等価物、DNA/RNAキメラ形、および／もしくは相補物を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 標的捕捉用オリゴヌクレオチドは、配列番号97、98、99、100、101もしくは104のヌクレオチド配列、またはそのDNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 標的捕捉用オリゴヌクレオチドの標的にハイブリダイズする領域は、配列番号97、98、99、100、101もしくは104のヌクレオチド配列、またはそのDNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形から本質的になる。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 標的捕捉用オリゴヌクレオチドの標的にハイブリダイズする領域は、配列番号97、98、99、100、101もしくは104のヌクレオチド配列、またはそのDNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形からなる。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 標的捕捉用オリゴヌクレオチドは、配列番号228、97、98、99、100、101もしくは104のヌクレオチド配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5つのミスマッチを有するヌクレオチド配列、またはそのDNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 標的捕捉用オリゴヌクレオチドは、配列番号97、98、99、100、101もしくは104のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有するヌクレオチド配列、またはそのDNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。SARS-CoV-2 標的捕捉用オリゴヌクレオチドは、1つまたは複数の改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを有し得る。

20

30

40

【0296】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 領域1 標的捕捉用オリゴヌクレオチドは、 T_nA_m 配列（この配列中、 n は、0～3の整数であり、 m は、14～50の整数である）に連結されている。一部の実施形態では、 n は、3であり、 m は、30である。一部の実施形態では、インフルエンザ標的捕捉用オリゴヌクレオチドは、配列番号91、92、93、94、95もしくは96のヌクレオチド配列、またはそのDNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。一部の実施形態では、インフルエンザ標的捕捉用オリゴヌクレオチドは、配列番号91、92、93、94、95もしくは96のヌクレオチド配列

50

、またはそのDNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形をから本質的になる。一部の
実施形態では、インフルエンザ標的捕捉用オリゴヌクレオチドは、配列番号91、92、
93、94、95もしくは96のヌクレオチド配列、またはそのDNA等価物もしくはD
NA/RNAキメラ形をからなる。一部の実施形態では、インフルエンザ標的捕捉用オリ
ゴヌクレオチドは、配列番号91、92、93、94、95もしくは96のヌクレオチド
配列と最大で0、1、2、3、4もしくは5つのミスマッチを有するヌクレオチド配列、
またはそのDNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。一部の実施形態では、
インフルエンザ標的捕捉用オリゴヌクレオチドは、配列番号91、92、93、94、9
5もしくは96のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少な
くとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有するヌクレオチド配列、またはその
DNA等価物もしくはDNA/RNAキメラ形を含む。SARS-CoV-2領域1プロ
モータープライマーは、1つまたは複数の改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログ
を有し得る。

10

【0297】

一部の実施形態では、組成物、製剤またはキットは、1つまたは複数の陽性対照を含有
する。陽性対照は、SARS-CoV-2領域1、SARS-CoV-2領域2、SAR
S-CoV-2領域3、インフルエンザA型領域1、インフルエンザA型領域2、インフ
ルエンザB型領域1またはインフルエンザB型領域2の標的配列を含有する核酸であり得
る。陽性対照は、DNA、RNA、プラスミド、またはin vitro転写物であり得
るが、これらに限定されない。

20

【0298】

検出ステップは、例えば、増幅産物を標識された検出用プローブとハイブリダイズする
こと、および標識されたプローブから得られるシグナル（一部の実施形態では、ハイブリ
ダイゼーション後にプローブから放出される標識からのものを含む）を検出することによ
るものなどの、増幅された標的配列に特異的に関連付けられるシグナルを検出するための
様々な公知の技法のいずれかを使用して行うことができる。一部の実施形態では、標識さ
れたプローブは、第2の部分、例えば、上で論じられたようなフルオロフォアなどの標識
と相互作用するクエンチャーまたは他の部分を含む。検出ステップによって、例えば、そ
の核酸塩基配列の全てまたは一部などの、増幅された配列に関する追加情報を得ることも
できる。検出は、増幅反応が終了した後に行ってもよく、または標的領域を増幅させるの
と同時に、例えば、リアルタイムで行ってもよい。一部の実施形態では、増幅された産物
は、増幅ステップの終了間近にまたは終了時に検出される。実施形態では、線状検出用プ
ローブが、プローブの増幅された産物へのハイブリダイゼーションを示すためのシグナル
を得るために使用される。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、ハイブリダイズしていないプロー
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行われる。

30

（例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際特許出願公開番号WO89/0024
76を参照されたい）。一部の実施形態では、検出は、リアルタイムで行われる。一部の
実施形態では、検出用プローブ、ヘアピンプローブ。ヘアピンプローブは、分子ビーコン
、分子トーチ、またはプローブが増幅された産物に結合すると検出されるレポーター部分
で標識されているハイブリダイゼーションスイッチプローブ（例えば、蛍光標識とクエン
チング部分の両方を含む二重標識ヘアピンプローブ）であり得るが、これらに限定されな
い。一部の実施形態では、ヘアピンプローブは、リアルタイム検出に使用される。一部の
実施形態では、検出プローブは、線状オリゴマー、例えば、フルオロフォアとクエンチン
グ部分の両方で標識されたオリゴマー（例えば、TaqManプローブ）などである。その
ようなプローブは、標的にハイブリダイズする配列および標的にハイブリダイズしない
配列を含み得る。そのようなプローブの様々な形態は、以前に記載されている（例えば、
米国特許第5,210,015号、同第5,487,972号、同第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、

40

50

および同第6, 361, 945号、ならびに米国特許出願公開第20060068417 A1号および同第20060194240 A1号を参照されたく、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる)。一部の実施形態では、ヘアピンプローブは、リアルタイム検出に使用される。一部の実施形態では、線状オリゴマーは、リアルタイム検出に使用される。例示的なSARS-CoV-2特異的検出用プローブオリゴマーは、下記の表39に収載され、さらに(例えば、SARS-CoV-2標的核酸の検出のための第1および第2のSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーと組み合わせてのそれらの使用を含めて)、上記の実施形態セクション、および下記の実施例2~13で示される。

【0299】

一部の実施形態では、検出は、時間間隔を置いて行われる。一定の時間間隔で蛍光を測定することにより、検出を行うことができる。時間間隔は、1~60秒、1~120秒、1~180秒、1~240秒、または1~300秒であり得るが、これらに限定されない。一部の実施形態では、時間間隔は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55または60秒である。一定の時間間隔で行われる検出について、各間隔は、サイクルと呼ばれる。検出を20~240サイクル、30~210サイクル、40~180サイクル、50~150サイクル、または60~120サイクルにわたって行うことができる。例えば、60分間、30秒ごとの検出が120サイクル継続する。検出は、サイクルの開始時または終了時に行われ得る。検出を継続的に行うこともできる。

マルチプレックス増幅および／または検出

【0300】

「マルチプレックス」増幅反応、例えば、等温増幅反応は、2つまたはそれより多くの異なる増幅産物またはアンプリコンが、2つまたはそれより多くの増幅用オリゴマーの組合せを同じ増幅反応で使用するることによって生成されることを特徴とする。マルチプレックス増幅反応は、2つの標的配列を増幅するために2つまたはそれより多くの増幅用オリゴマーの組合せ(例えば、2つまたはそれより多くの、第1の(NT7)プライマーと第2の(プロモーター)プライマーのセット)を含む。マルチプレックス増幅系は、マルチプレックス増幅および／または検出反応を行うための、組成物、製剤、反応ミックス、またはキットを含む。増幅用オリゴマーの組合せに加えて、マルチプレックス増幅系は、対応するアンプリコンを検出するための2つもしくはそれより多くのプローブ、および／または2つもしくはそれより多くのTCOをさらに含み得る。

【0301】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2を増幅する、および／またはSARS-CoV-2の存在または非存在を検出するための、マルチプレックス増幅系は、以下からなる群から選択される2つまたはそれより多くの増幅用オリゴマーの組合せを含む：

(a) SARS-CoV-2の第1の領域(領域1)内の標的配列を増幅するための第1の増幅用オリゴマーの組合せ；

(b) SARS-CoV-2の第2の領域(領域2)内の標的配列を増幅するための第2の増幅用オリゴマーの組合せ；

(c) 対照標的核酸中の標的配列を増幅するための対照増幅用オリゴマーの組合せ；および

(d) 1つまたは複数の非SARS-CoV-2微生物(例えば、非SARS-CoV-2病原体)におけるもう1つの標的配列を増幅するための1つまたは複数の増幅用オリゴマーの組合せ。

上記マルチプレックス増幅系のいずれも、増幅用オリゴマーの組合せおよび／またはSARS-CoV-2標的核酸もしくは内部対照標的核酸を捕捉するための1つもしくは複数のTCOにより生成されるアンプリコンを検出するためのプローブをさらに含み得る。

【0302】

マルチプレックス増幅系に利用されるプローブを、マルチプレックス検出アッセイにおいていずれか1つのプローブ種(またはある種を検出するためのプローブ)を他のプローブ種(または他の種を検出するためのプローブ)と区別することができるように、標識す

ることができる。一部の実施形態では、一方または両方のSARS-CoV-2アンプリコンを検出するためのプローブを、内部対照アンプリコンを検出するためのプローブと区別することができる。SARS-CoV-2標的核酸の2つの異なる領域を増幅するための増幅用オリゴマーの組合せを有するマルチプレックス増幅反応において、SARS-CoV-2アンプリコンを検出するためのプローブは、同じまたは異なる標識を利用することができる。標識は、フルオロフォア、およびフルオロフォア／クエンチャー組合せ（すなわち、Matthews and Kricka, Analytical Biochemistry, vol. 169 (1988), pp: 1-25に記載されているようなFRETハイブリダイゼーションプローブ）であり得るが、これらに限定されない。

【0303】

SARS-CoV-2核酸の検出のための組成物、製剤、キットおよび方法は、必要に応じて、非SARS-CoV-2内部対照（IC）核酸の増幅および／または検出のためのオリゴヌクレオチドを含み得る。対照は、IC配列に特異的な増幅用および検出用オリゴマーを使用することにより同じアッセイ反応混合物または平行アッセイ反応混合物中で増幅され、検出される。IC核酸配列は、例えば、DNAプラスミド、RNA鋳型配列（例えば、in vitro転写物）、または試料にスパイクされる合成核酸であり得る。あるいは、IC核酸配列は、細胞の成分であることがあり、この成分は、検体に関して外来性の細胞源または内在に由来し得る。これらの事例では、内部対照核酸は、増幅反応混合物中のSARS-CoV-2核酸と共増幅される。内部対照増幅産物およびSARS-CoV-2標的配列増幅産物を独立して検出することができる。

【0304】

ある特定の実施形態では、増幅されたIC配列からのシグナルの増幅および検出は、いずれのシグナルも所期の標的SARS-CoV-2核酸について得られなかった（例えば、SARS-CoV-2の検査で陰性の試料）場合、アッセイ試薬、装置、条件、およびアッセイステップの実行が、機能しており、アッセイで適切に使用されたことを実証する。定量的結果が所望される場合、ICをアッセイの内部キャリブレーターとしても使用することもでき、すなわち、IC増幅および検出から得られたシグナルは、増幅されたSARS-CoV-2標的配列について得られたシグナルに基づいて試料中のSARS-CoV-2核酸の量を定量するためのアルゴリズムに使用されるパラメーターを設定するために使用される。ICは、アッセイにおける1つまたは複数のステップの完全性のモニタリングにも有用である。IC標的配列のためのプライマーおよびプローブは、任意の周知の方法を使用することにより構成および合成されるが、ただし、プライマーおよびプローブが、SARS-CoV-2標的配列を増幅および検出するために使用されるのと実質的に同じアッセイ条件を使用してIC標的配列の増幅および増幅されたIC配列の検出のために機能することを条件とする。標的捕捉に基づく精製ステップを含む一部の実施形態では、IC標的に特異的な標的捕捉用プローブは、標的捕捉ステップのアッセイに含まれ、したがって、ICは、アッセイステップの全てにおいて所期のSARS-CoV-2分析物に対する処理と類似した様式でアッセイにおいて処理される。

【0305】

試料中のSARS-CoV-2の存在または非存在を決定するための製剤およびキットが記載される。一部の実施形態では、製剤またはキットは、SARS-CoV-2における標的配列を増幅するための少なくとも1つのプライマーセット（増幅用オリゴマーの組合せ）を含む。一部の実施形態では、製剤またはキットは、SARS-CoV-2における2つの異なる標的配列を増幅するための少なくとも2つのプライマーセット（増幅用オリゴマーの組合せ）を含む。本明細書に記載される製剤または組成物のいずれも、水溶液として提供され得る。一部の実施形態では、製剤は、（1）本明細書に記載のSARS-CoV-2標的領域の増幅のための少なくとも2つのSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーと（2）有機緩衝剤とを含む水性製剤である。一部の実施形態では、製剤は、（1）本明細書に記載の2つの異なるSARS-CoV-2標的領域の増幅のための少なくとも4つのSARS-CoV-2特異的増幅用オリゴマーと（2）有機緩衝剤とを含む

10

20

30

40

50

水性製剤である。一部の実施形態では、製剤またはキットは、増幅用オリゴマーにより生成されるアプリーコンを検出するためのプローブをさらに含む。SARS-CoV-2 核酸の増幅のためのキットまたは水性製剤は、1つまたは複数のさらなる成分、例えば、DNA ポリメラーゼ酵素、逆転写酵素、または検出用プローブオリゴマーなどを含み得る。一部の実施形態では、製剤は、(1) 本明細書に記載の SARS-CoV-2 特異的検出用プローブオリゴマーと(2) 有機緩衝剤とを含む水性製剤である。1つまたは複数の検出用プローブオリゴマーを含むキットまたは水性製剤は、1つまたは複数のさらなる成分、例えば、界面活性剤、DNA ポリメラーゼ酵素、逆転写酵素、または少なくとも1つの増幅用オリゴマーなどを含み得る。特に好適な界面活性剤としては、例えば、ポリエチレングリコールモノ[4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェニル]エーテルおよびポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル(例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート40、またはポリソルベート60)が挙げられる。一部の実施形態では、水性検出用プローブ製剤中の界面活性剤は、非線状界面活性剤(すなわち、分岐鎖構造を有する界面活性剤)、例えば、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル(例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート40、またはポリソルベート60)またはジギトニンなどである。SARS-CoV-2 核酸の増幅または検出のための上記のキットまたは水性製剤は、増量剤、例えば、トレハロース、ラフィノース、またはこれらの組合せなどをさらに含み得る。一部の実施形態では、上記の水性製剤は、例えば、マグネシウム、カリウムまたはナトリウムなどの、無機塩を含有し、一部のそのような変形形態では、無機塩の濃度は、4 mM またはそれ未満である。上記の水性製剤に特に好適な有機緩衝剤は、Tris(2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)-1, 3-プロパンジオール)である。一部の実施形態では、キットは、標的捕捉試薬(TCR)、増幅(AMP)試薬、およびプロモーター試薬のうちの1つまたは複数のさらなる含有し得る。キットは、緩衝剤、酵素試薬、RNA ポリメラーゼ、dNTP、NTP、試料輸送培地、標的捕捉洗浄溶液、標的エンハンサー試薬、および再構成試薬のうちの1つまたは複数のさらなる含有し得る。

10

20

30

40

50

【0306】

記載される水性製剤のいずれも、当技術分野において公知の手順に従って、例えばバイアル、アンプル、マルチウェルプレートまたは他の容器に、分取し、乾燥させる(例えば、凍結乾燥させる)ことができる。乾燥製剤は、長期保管に使用され得る。乾燥産物は、概して、粉末またはケーキのように見える。次いで、概して、容器は密封される。一部の実施形態では、乾燥製剤アリコートは、マルチウェルプレートのウェルに移され、次いで、マルチウェルプレートは密封される。そのような乾燥製剤を水性製剤から調製する方法、およびそのような方法により調製された乾燥製剤は、本開示のさらなる態様である。一部の実施形態では、本明細書に記載の水性製剤への再構成を可能にする乾燥製剤が提供される。SARS-CoV-2 核酸の増幅または検出のための乾燥製剤は、本明細書に記載の1つまたは複数の増幅用オリゴマーおよび/または検出用プローブに加えて、増量剤、例えば、トレハロース、ラフィノース、またはこれらの組合せなどを概して含有する。一部の実施形態では、製剤は、無機塩をさらに含む。一部の実施形態では、無機塩の質量の乾燥製剤の質量に対するパーセントは、0.249%もしくはそれ未満、0.222%もしくはそれ未満、または0.195%もしくはそれ未満である。本明細書に記載の凍結乾燥製剤から水性製剤を調製する方法もまた本開示により包含され、そのような方法は、一般に、乾燥製剤を好適な希釈剤(例えば、有機緩衝剤または水)に溶解して再構成された製剤を得るステップを含む。

【0307】

試料中の SARS-CoV-2 標的核酸の存在または非存在を決定するための反応混合物も提供される。本開示による反応混合物は、(1) SARS-CoV-2 標的核酸の増幅のための本明細書に記載のオリゴマーの組合せ、および(2) SARS-CoV-2 増幅産物の存在または非存在を決定するための本明細書に記載の1つまたは複数の検出用プローブオリゴマーの、一方または両方を含む。反応混合物は、1つまたは複数のさらなる成分、例えば、TCOまたは非特異的捕捉用プローブ、例えば、参照により本明細書に組

み込まれるUS2013/0209992に記載されているようなポリマー（k）捕捉用プローブなどを、さらに含み得る。増幅反応混合物の場合、反応混合物は、*in vitro*増幅を行うために好適な他の試薬、例えば、緩衝剤、塩溶液、適切なヌクレオチド三リン酸（例えば、dATP、dCTP、dGTPおよびdTTP；ならびに／またはATP、CTP、GTPおよびUTP）、および／または酵素（例えば、熱安定性DNAポリメラーゼ、または逆転写酵素および／もしくはRNAポリメラーゼ）などを概して含み、SARS-CoV-2標的核酸が存在しなくてもよい検査試料成分を概して含む。反応混合物は、SARS-CoV-2ゲノムの1つだけの標的領域のための増幅用オリゴマーを含むこともあり、または複数のSARS-CoV-2標的領域のための増幅用オリゴマーを含むこともある。加えて、検出用プローブを増幅用オリゴマーの組合せとともに含む反応混合物の場合、反応混合物のための増幅用オリゴマーおよび検出用プローブオリゴマーの選択は、共通の標的領域により関連付けられる（すなわち、反応混合物は、反応混合物の増幅用オリゴマーの組合せにより増幅可能な配列に結合するプローブを含む）。一部の実施形態では、反応混合物は、上記の水性製剤を含む。一部の実施形態では、反応混合物は、水、再構成試薬、または上記の乾燥製剤からの有機緩衝剤で、再構成される。一部の実施形態では、反応混合物は、TCOおよびプライマーを含む。一部の実施形態では、反応混合物は、TCO、プライマーセット、およびプローブを含む。

10

【0308】

本明細書に記載の方法を実施するためのキットも、本明細書で提供される。本開示によるキットは、（1）SARS-CoV-2標的核酸の増幅のための本明細書に記載のオリゴマーの組合せ、および（2）SARS-CoV-2増幅産物の存在または非存在を決定するための本明細書に記載の1つまたは複数の検出用プローブオリゴマーの、一方または両方を含む。キットは、いくつかの必要に応じた構成要素、例えば、TCOまたは捕捉用プローブ、例えば、US2013/0209992に記載されているようなポリマー（k）捕捉用プローブなどを、さらに含み得る。キットに存在し得る他の試薬としては、*in vitro*増幅を行うために好適な試薬、例えば、緩衝剤、塩溶液、適切なヌクレオチド三リン酸（例えば、dATP、dCTP、dGTP、dTTP；ならびに／またはATP、CTP、GTPおよびUTP）、および／または酵素（例えば、熱安定性DNAポリメラーゼ、または逆転写酵素および／もしくはRNAポリメラーゼ）などが挙げられる。本明細書に記載のオリゴマーを、様々な異なる実施形態で包装することができ、当業者には、本開示が多く異なるキット構成を包含することは理解されるであろう。例えば、キットは、SARS-CoV-2ゲノムの1つだけの標的領域のための増幅用オリゴマーを含むこともあり、または複数のSARS-CoV-2標的領域のための増幅用オリゴマーを含むこともある。加えて、検出用プローブを増幅用オリゴマーの組合せとともに含むキットの場合、キットのための増幅用オリゴマーおよび検出用プローブオリゴマーの選択は、共通の標的領域により関連付けられる（すなわち、キットは、キットの増幅用オリゴマーの組合せにより増幅可能な配列に結合するプローブを含む）。一部の実施形態では、キットは、本開示による方法を実施するための一連の使用説明書をさらに含み、使用説明書は、添付文書、および／またはキットもしくはその構成要素の包装に付随し得る。

20

30

【0309】

組成物、キット、製剤、反応混合物、および方法は、以下の非限定的な実施例によってさらに例証される。

40

【実施例】

【0310】

（実施例1）

プライマーとプローブの異なる組合せを使用するコロナウイルスのリアルタイムPCR増幅および検出

本実施例は、コロナウイルスのリアルタイムPCR増幅および検出のためのプライマーとプローブの組合せを検査するスクリーニング実験を記載する。反応は、一般に、本明細書で提示するようにおよび以下のように準備し、行う。

50

【0311】

いくつかのプライマーとプローブの混合物（PPRミックス）を、微量遠心管の中で、フォワードプライマー、リバースプライマー、および二重標識ヘアピン検出用プローブを含むように調製した。内部対照PPRミックスは、 $0.625\mu\text{M}$ の各プライマーおよび $0.5\mu\text{M}$ のプローブを含み、その一方で、コロナウイルスPPRミックスは、 $1.25\mu\text{M}$ のプライマーおよびプローブの各々を含有する。これらのPPRミックスは、 150mM のKCl、 10mM MgCl_2 も含有し、 10mM TRISを使用して最終体積にした。IC検出用プローブをQuasar 705およびBlack Hole Quencher 2で標識し、各コロナウイルス（「CoV」）検出用プローブを、FAMおよびBlack Hole Quencher 1（全て、BioSearch Technologies, Inc.、Novato、CAまたはGlen Research, Inc.、Sterling、VAから入手可能）で標識した。

10

【0312】

等体積の内部参照PPRミックス（ $275\mu\text{L}$ ）をコロナウイルス混合物の各々（ $275\mu\text{L}$ ）に添加して、 $1.25\times$ PPRミックス（総体積 $550\mu\text{L}$ ）を得た。 $20\mu\text{L}$ の各PPRミックスおよび $5\mu\text{L}$ の標的核酸（例えば、合成標的核酸または精製ウイルス）溶出物を、dNTP dUTP、Taqポリメラーゼ、逆転写酵素およびRNase阻害剤を含有する、 $1.25\times$ マスターミックスと混ぜ合わせるにより、増幅および検出用反応物を調製した。次いで、増幅および検出用混合物の各々に油を重層した。合成コロナウイルス標的核酸をストック濃度から調製して、反応あたり $5\mu\text{L}$ アリコートで1,000コピー（200コピー/ μL ）の濃度を得た。希釈物を試料輸送培地（ラウリル硫酸リチウム（LLS）、EDTA、およびリン酸ナトリウムを含有する）にした。増幅および検出反応を、条件ごとに、標的核酸に対して陽性の6反応および標的核酸に対して陰性の6反応という12反応で設定した。陰性反応は、コロナウイルス標的核酸を伴わない試料輸送培地を含む。Panther Fusionシステム（Hologic, Inc.、Marlborough MAから入手可能）を使用して温度サイクリングによりリアルタイムで反応を行った。Panther FusionシステムのMyAccess Tool、およびJMPチャート分析を使用して、データを分析した。

20

【0313】

得られた増幅曲線を、陽性試料のCtおよびRFUシグナルと陰性試料のバックグラウンドRFUの差について評価する。

30

【0314】

（実施例2）

SARS-CoV-2プライマーとプローブのミックスの直線性および感度テスト

個別のおよび組み合わせた直線性および感度検査を、*in vitro* 転写物（試料輸送培地（STM）に懸濁し、1,000のHeLa細胞/mLを補充したIVT）で行った。これらの実験を2段階で行った。第1段階では、1,000コピー/反応のIVT（配列番号2および3）を、個別のプライマーとプローブのセット（表1を参照されたい）、および組み合わせたオリゴセットで検査して、これらのプライマーとプローブの組合せについてのそれらの個別のおよび組み合わせた性能特性についての情報を集めた。第2段階では、組み合わせたオリゴセットの直線性および感度を、 1×10^7 （ $1\text{E}+7$ ）コピー/反応～10コピー/反応の範囲のIVT（配列番号2および3）の7つの濃度レベルで検査した。

40

【0315】

2つのSARS-CoV-2プライマーとプローブ（PPR）のミックスを、上の実施例1で一般に説明したように調製した。これらのSARS-CoV-2 PPRミックスは、アナログヌクレオチドを含み、フルオロフォア/クエンチャーの配置を変えた、示されているプライマーおよびプローブを含んでいた（表1を参照されたい）。Quasar 705（Q705）；CalRed 610、Black Hole Quencher 1（BHQ-1）；およびBlack Hole Quencher 2（BHQ-2）

50

は、Biosearch Technologies, Inc.、Novato, CAから入手可能である。5MeCは、Sigma-Aldrich Corp.、St. Louis, MOから入手可能である。プロピン dUは、Glen Research、Sterling, VAから入手可能である。陽性反応を次のように設定した：(i) SARS-CoV-2 PPRミックス1およびIC PPRミックス；(ii) SARS-CoV-2 PPRミックス5およびIC PPRミックス；ならびに(iii) SARS-CoV-2 PPRミックス1、SARS-CoV-2 PPRミックス5、およびIC PPRミックス。陰性反応は、IC PPRミックスのみを含有した。陽性反応および陰性反応の各々を、段階1については6の倍数の反応数、および段階2については12の倍数の反応数で実行した。

10

【表1】

表1. SARS-CoV-2プライマーとプローブの混合物の配列。

PPR ミックス	フォワードプライマー	リバースプライマー	検出用プローブ
内部対照 (IC) PPR ミックス	配列番号 4	配列番号 5	配列番号 9 5' Q705 3' BHQ-2
SARS-CoV-2 PPR ミックス 1	配列番号 12 残基 1 および 9 における 5MeC	配列番号 13	配列番号 14 5' CalRed 610 残基 3、7、11、12、18、21、および 23 における 5MeC 3' BHQ-2
SARS-CoV-2 PPR ミックス 5	配列番号 15	配列番号 16 残基 5、10、および 16 におけるプロピン dU 残基 13、14、21、および 23 における 5MeC	配列番号 17 5' CalRed 610 残基 3、4、7、10、16、22、25、および 27 における 5MeC 3' BHQ-2

20

30

【0316】

表2は、個別のおよび組み合わせたプライマー／プローブ混合物についての結果の概要を示す。IC反応は、検査した全ての条件で100%検出を示した。組み合わせたオリゴセットで問題点は観察されなかった。上の(iii)に列挙した組み合わせたPPRミックスについての直線性および感度データを、表3および図1に要約する。これらの結果は、両方のIVTの100%検出が100cp/rxnに至るまで見られたことを示す。PCR効率は、R²値>0.99および-3.33の勾配で高かった。ICは、全ての希釈物において100%検出を示した。

【表2】

40

表2.個別のおよび組み合わせたオリゴセットについての結果の概要(段階1)。

オリゴセット	反応性	IVT 濃度 (cp/rxn)	平均 Ct	標準偏差 Ct	平均 RFU	標準偏差 RFU	平均 Tslope	標準偏差 Tslope
SARS2 PPR ミックス 1	6/6	10,000	27.85	0.13	112915	1,783	715	174
SARS2 PPR ミックス 5	6/6	10,000	27.66	0.11	63,339	971	649	52
SARS2 PPR ミックス 1 および 5	6/6	10,000	26.81	0.09	84,401	1,034	577	24

50

【表 3】

表3.組み合わせたオリゴセットについてのIVT感度結果(段階2)。

IVT 濃度 (cp/rxn)	反応性	平均 Ct	標準偏差 Ct	平均 RFU	標準偏差 RFU	平均 Tslope	標準偏差 Tslope
10,000,000	11/12	16.13	0.09	88435	2581	971	142
1000000	12/12	19.87	0.22	85128	4271	810	214
100000	12/12	22.59	0.14	84935	2914	670	47
10000	12/12	26.16	0.28	81974	2284	782	176
1000	12/12	29.60	0.41	74777	4026	750	43
100	12/12	32.45	0.26	62556	2939	751	89
10	12/12	36.48	0.92	29578	13083	711	156

10

【0317】

(実施例3)

HeLa細胞の存在下でのウイルス感度実験

表1からのSARS-CoV-2 PPRミックス1、SARS-CoV-2 PPRミックス5およびIC PPRミックスの各々を含有する、組み合わせたPPRミックスの感度および直線性を明らかにするために、特定のウイルス株を検査した。陰性反応は、IC PPRミックスのみであった。ウイルス株は、SARS関連コロナウイルス2、分離株USA-WA1/2020 (BEI Resources、NIAID、NIHを通して入手したNR-52281)であった。ウイルスのストック濃度は、37℃および5%CO₂で6日後に 2.8×10^5 TCID₅₀であった。ストックウイルスを、10,000のHeLa細胞/mLを含有するSTMにスパイクし、 $1.4 \sim 1.4 \times 10^{-4}$ TCID₅₀/mLの範囲の6つの作業濃度に希釈した(表4)。陽性および陰性反応を三連で実行した。ウイルスの直線性および感度検査の結果を表4に示すとともに、図2に対応する直線性プロットを示す。これらの結果は、100%検出(3/3反復)がウイルス株について 1.4×10^{-3} TCID₅₀/mLの濃度に至るまで観察されたことを示す。全ての検査条件下でICを検出した。

20

30

【表 4】

表4.組み合わせたオリゴセットについてのウイルス感度結果。

ウイルス濃度 (cp/rxn)	反応性	平均 Ct	標準偏差 Ct	平均 RFU	標準偏差 RFU	平均 Tslope	標準偏差 Tslope
14	3/3	25.20	0.08	78060	1708	869	61
1.4	3/3	27.76	0.08	78937	765	579	28
1.4E-1	3/3	31.40	0.21	65578	604	726	99
1.4E-2	3/3	34.51	0.62	50532	6808	565	19
1.4E-3	3/3	37.23	0.99	22957	12130	826	76
1.4E-4	0/3	N/A	N/A	-2	24	N/A	N/A

40

【0318】

(実施例4)

特異性および干渉実験(パネルおよび特異的MERS/SARSテスト)

組み合わせたPPRミックスの交差反応性を、気道感染症の際に一般に見られる53の微生物で評価した。これらの微生物を、表5に収載するように16パネルに群分けし、表1からのSARS-CoV-2 PPRミックス1、SARS-CoV-2 PPRミッ

50

クス5およびIC PPRミックスの各々を含有する、組み合わせたPPRミックスを使用して検査した。ストック濃度の各生物を試料輸送培地にスパイクして、最終濃度微生物試料を形成した。次いで、最終濃度の各生物を、表5に記載の16の異なるパネルのうちの1つにプールした。360μLの各パネルを抽出し、360μLの溶出物のうちの5μLを最終PCR反応で使用した。1回の抽出および3回のPCR反復を各パネルに行った。10,000コピー／反応の濃度のIVT（配列番号2および3）を陽性対照として使用した。検査した全てのパネルは、組み合わせたPPRミックスを使用した場合、SARSCoV-2について陰性であった。組み合わせたPPRミックスを使用した場合、陽性対照反応は陽性であり、陰性対照反応は陰性であった。特異性結果を表6に要約する。特異性実験と同時に干渉も評価した。10,000コピー／反応の濃度の対応するIVTについての反応性を、表5に記載するパネルの存在下で評価した。結果を表6に要約する。IVTは、検査した全てのパネルで検出される。検査したいずれの微生物もSARSCoV-2 PPRミックスによって検出されなかった（すなわち、SARSCoV-2 PPRミックスは、チャレンジ生物のいずれとも交差反応しなかった）。同様に、いずれの微生物も、PPRミックスによるSARSCoV-2 標的核酸の検出に干渉しなかった。

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表5.特異性および干渉について検査した微生物の概要

パネル	生物	製造業者	株/ 細胞系	ATTC/PN 番 号	単位	ストック濃 度	最終濃度
1	アデノウイルス培 養液	ZeptoMetrix	1 型	0810050CF	TCID ₅₀ /mL	1.02E+08	1.00E+06
	アデノウイルス培 養液	ZeptoMetrix	4 型	0810070CF	TCID ₅₀ /mL	2.19E+06	1.00E+04
	アデノウイルス培 養液	ZeptoMetrix	7A 型	0810021CF	TCID ₅₀ /mL	9.55E+06	1.00E+05
	流行性耳下腺炎 ウイルス培養液	ZeptoMetrix	分離株 1	0810079CF	TCID ₅₀ /mL	1.05E+06	1.00E+04
2	麻疹ウイルス培養 液	ZeptoMetrix	NA	0810025CF	TCID ₅₀ /mL	2.45E+05	1.00E+03
	Corynebacterium diphtheriae	ZeptoMetrix	Z116	CFU/mL	CFU/mL	4.00E+09	1.00E+06
	サイトメガロウィ ルス(CMV)培養液	ZeptoMetrix	AD-169	0810003CF	TCID ₅₀ /mL	2.19E+06	1.00E+04
	エプスタインバー ウイルス(EBV) 培 養液	ZeptoMetrix	B95-8	0810008CF	cp/mL	7.70E+07	1.00E+06
3	水痘帯状疱疹ウ イルス(VZV)培養 液	ZeptoMetrix	82 株	0810167CF	cp/mL	2.03E+10	1.00E+08
	水痘帯状疱疹ウ イルス(VZV)培養 液	ZeptoMetrix	82 株	0810167CF	cp/mL	1.00E+08	1.00E+06
	単純ヘルペスウイ ルス 1 型(HSV-1) 培養液	ZeptoMetrix	MacIntyre	0810005CF	TCID ₅₀ /mL	3.80E+06	1.00E+04
	ヒトヘルペスウイ ルス 6B 型(HHV- 6B)培養液	ZeptoMetrix	Z29	0810072CF	cp/mL	4.22E+08	1.00E+06
	ヒトヘルペスウイ ルス 7 型(HHV-7) 培養液	ZeptoMetrix	SB	0810071CF	TCID ₅₀ /mL	1.15E+07	1.00E+05
4	ヒトメタニューモウ イルス(hMPV)20 型 A2 培養液	ZeptoMetrix	IA14-2003	0810163CF	TCID ₅₀ /mL	4.07E+07	1.00E+04
	ヒトメタニューモウ イルス(hMPV)3 型 B1 培養液	ZeptoMetrix	ペルー2-220	0810156CF	TCID ₅₀ /mL	3.16E+06	1.00E+04
	ヒトメタニューモウ イルス(hMPV)4 型 B2 培養液	ZeptoMetrix	ペルー1- 2002	0810157CF	TCID ₅₀ /mL	5.37E+08	1.00E+06
	ヒトメタニューモウ イルス(hMPV)9 型 A1 培養液	ZeptoMetrix	IA3-2002	0810160CF	TCID ₅₀ /mL	1.58E+09	1.00E+06
5	インフルエンザ A 型 H1N1 ウイルス 培養液	ZeptoMetrix	台湾/42/06	0810247CF	TCID ₅₀ /mL	1.17E+05	1.00E+03
	インフルエンザ B 型培養液	ZeptoMetrix	B/フロリダ /04/06	0810255CF	TCID ₅₀ /mL	1.41E+05	1.00E+03

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

	呼吸器合胞体ウイルス A 型(RSV-A)培養液	ZeptoMetrix	分離株 2006	0810040ACF	TCID50/mL	1.00E+06	1.00E+03
	呼吸器合胞体ウイルス B 型(RSV-B)培養液	ZeptoMetrix	CH93(18)-18	0810040CF	TCID50/mL	7.24E+05	1.00E+03
6	パラインフルエンザウイルス培養液	ZeptoMetrix	1 型	0810014CF	TCID50/mL	5.01E+05	1.00E+03
	パラインフルエンザウイルス培養液	ZeptoMetrix	2 型	0810015CF	TCID50/mL	2.45E+05	1.00E+03
	パラインフルエンザウイルス培養液	ZeptoMetrix	3 型	0810016CF	TCID50/mL	5.89E+07	1.00E+05
	パラインフルエンザウイルス培養液	ZeptoMetrix	4A 型	0810060CF	TCID50/mL	5.01E+05	1.00E+03
7	ライノウイルス培養液	ZeptoMetrix	B14 型	0810284CF	TCID50/mL	1.51E+06	1.00E+04
	ライノウイルス培養液	ZeptoMetrix	1A 型	0810012CFN	TCID50/mL	4.17E+05	1.00E+03
	エンテロウイルス 68 型培養液	ZeptoMetrix	分離株 2007	0810237CF	TCID50/mL	2.19E+06	1.00E+04
	エンテロウイルス 71 型培養液	ZeptoMetrix	分離株 200E	0810236CF	TCID50/mL	8.51E+07	1.00E+05
8	E. coli	Hologic	GP1914	43653	CFU/mL	1.00E+08	1.00E+06
	H. influenzae	Hologic	GP1915	51654	CFU/mL	1.00E+08	1.00E+06
	Mycobacterium tuberculosis	ZeptoMetrix	H37Ra-1	801660	TCID50/mL	6.08E+07	1.00E+06
	L. plantarum	Hologic	GP1916	8014	CFU/mL	1.00E+08	1.00E+06
9	Legionella pneumophila	Hologic	GP0004	33152	CFU/mL	1.00E+08	1.00E+06
	Bordetella pertussis	Hologic	GP0267	8467	CFU/mL	1.00E+09	1.00E+06
	Mycoplasma pneumoniae	Hologic	GP0100	29342	CFU/mL	1.00E+08	1.00E+06
	Moraxella catarrhalis	Hologic	GP0119	25238	CFU/mL	1.00E+08	1.00E+06
10	N. meningitidis	Hologic	GP0755	13077	CFU/mL	1.00E+09	1.00E+06
	N. mucosa	Hologic	GP0190	19696	CFU/mL	1.00E+08	1.00E+06
	P. aeruginosa	Hologic	GP1917	19142	CFU/mL	1.00E+08	1.00E+06
	S. aureus	Hologic	GP0018	12600	CFU/mL	1.00E+08	1.00E+06
11	S. epidermidis	Hologic	GP1918	35984	CFU/mL	1.00E+08	1.00E+06
	S. pneumoniae	Hologic	GP1919	49619	CFU/mL	1.00E+08	1.00E+06
	S. pyogenes	Hologic	GP1920	19615	CFU/mL	1.00E+08	1.00E+06
	S. salivarius	Hologic	GP0816	13419	CFU/mL	1.00E+08	1.00E+06
12	Pneumocystis jirovecii (PJP)/ P. Carinii	Hologic	S0385	S0385	N/A	1.00E+08	1.00E+06
	Chlamydia pneumonia	ATCC; VR-1356	2023	70019109	IFU/mL	4.00E+07	1.00E+05
13	ヒトコロナウイルス 229E 型	ATCC	N/A	VR-740	TCID50/mL	8.90E+06	1.00E+05
	ヒトコロナウイルス OC43 型	ZeptoMetrix	HCT-8	0810024CF	TCID50/mL	1.26E+06	1.00E+04
	ヒトコロナウイルス NL63 型	ZeptoMetrix	ペロ	0810228CF	TCID50/mL	5.62E+04	1.00E+03

【表 5 - 3】

14	MERS-コロナウイルス	BEI Resources	EMC/2012	NR-50549	TCID50/mL	8.90E+05	1.00E+04
15	SARS-コロナウイルス (IVT)	Hologic	N/A	N/A	コピー/mL	2.89E+09	1.00E+06
16	HKU1 (IVT)	Hologic	N/A	N/A	コピー/mL	2.89E+09	1.00E+06

10

20

30

40

50

【表 6】

表6.特異性および干渉結果の概要。

パネル	特異性	干渉						
	反応性	反応性	平均 Ct	標準偏差 Ct	平均 RFU	標準偏差 RFU	平均 Tslope	標準偏差 Tslope
1	0/3	3/3	29.97	0.13	77759	1396	712	246
2	0/3	3/3	28.82	0.09	84682	643	602	32
3	0/3	3/3	29.43	0.12	78162	603	713	54
4	0/3	3/3	29.71	0.21	79299	3423	604	60
5	0/3	3/3	29.10	0.04	81778	3052	913	23
6	0/3	3/3	29.07	0.04	80113	2386	971	22
7	0/3	3/3	29.65	0.16	76887	1324	626	59
8	0/3	3/3	30.08	0.10	74341	868	765	220
9	0/3	3/3	29.22	0.09	79175	2256	850	79
10	0/3	3/3	29.09	0.04	81210	2960	940	27
11	0/3	3/3	29.01	0.13	83299	3919	652	198
12	0/3	3/3	29.79	0.24	77604	2803	737	207
13	0/3	3/3	29.82	0.16	80463	2466	570	49
14	0/3	3/3	34.59	0.45	20679	5560	781	140
15	0/3	3/3	34.04	0.31	31426	679	604	120
16	0/3	3/3	33.97	0.17	29011	2160	805	191
陽性対照	3/3	3/3	29.22	0.11	81078	2585	835	77

【0319】

(実施例5)

異なる組合せのプライマーおよびプローブを使用するSARS-CoV-2の等温増幅およびリアルタイム検出。

本実施例は、SARS-CoV-2のリアルタイム等温増幅および検出のためのいくつかのプライマーとプローブの組合せを検査するスクリーニング実験を記載する。反応を、一般に、本明細書で提示するようにおよび以下のように準備し、行った。

【0320】

等温アッセイで一般に使用される試料、溶解および標的捕捉試薬は、以下を含む。試料輸送試薬：110mMラウリル硫酸リチウム(LLS)、15mM NaH₂PO₄、15mM Na₂HPO₄、1mM EDTA、1mM EGTA、pH6.7。溶解緩衝液：790mM HEPES、230mMコハク酸、10% (w/v) LLS、および680mM LiOH-水和物。標的捕捉試薬(TCR)：250mM HEPES、1.88M LiCl、310mM LiOH、100mM EDTA、pH6.4、および(dT)14オリゴマーが共有結合している250μg/mlの常磁性粒子(0.7~1.05マイクロメートル粒子、Sera-Mag(商標)MG-CM)。洗浄溶液：10mM HEPES、150mM NaCl、6.5mM NaOH、1mM EDTA、0.3% (v/v) エタノール、0.02% (w/v) メチルパラベン、0.01% (w/v) プロピルパラベン、および0.1% (w/v) ラウリル硫酸ナトリウム、pH7.5。等温アッセイで一般に使用される増幅試薬は、以下を含む。増幅試薬：125mM HEPES、26.7mM rATP、33.3mM rGTP、5mMのrCTPおよびUTPの各々、1.33mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTPの各々、8% (w/v) トレハロース、pH7.7、これにプライマーおよびプローブを添加して

もよい。リアルタイム増幅試薬：11.61mM Tris塩基、14.94mM Tris-HCl、28.5mM MgCl₂、23.30mM KCl、3.3%グリセロール、0.02%PROCLIN 300、0.05mM酢酸亜鉛二水和物、0.76mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTPの各々、6.50mMのATP、CTPおよびGTPの各々、7.50mM UTP、これにプライマーおよびプローブを添加してもよい。等温アッセイで一般に使用される酵素試薬は、以下を含む。酵素試薬：57.46mM HEPES、49.58mM N-アセチル-L-システイン、0.98mM EDTA遊離酸、0.039mM EDTA二ナトリウム二水和物、0.10v/v TRITON（登録商標）X-100、49.61mM KCl、0.20v/vグリセロール、0.03w/vトレハロース二水和物、ならびに反応あたり約90U/μlのMMLV逆転写酵素（RT）、および反応あたり約20U/μlのT7 RNAポリメラーゼ（この場合、1UのRTは、10分間、37℃で、200~400μMの、オリゴdTでプライミングされたポリA鋳型を使用して1nmolのdTTPを組み込み、1UのT7 RNAポリメラーゼは、1時間、37℃で、DNA鋳型中のT7プロモーターを使用して1nmolのATPをRNAに組み込む）。AE標識検出用プローブ反応で一般に使用される試薬は、以下を含む。アクリジニウムエステル（AE）標識プローブ用のプローブ試薬：（a）100mMコハク酸Li、3%（w/v）LLS、10mMメルカプトエタンスルホネート（MES）、および3%（w/v）ポリビニルピロリドン、または（b）100mMコハク酸Li、0.1%（w/v）LLS、および10mM MESの溶液。ハイブリダイゼーション試薬：（C型）100mMコハク酸、2%（w/v）LLS、100mM LiOH、15mMアルドリチオール-2、1.2M LiCl、20mM EDTA、および3.0%（v/v）エタノール、pH4.7。選択試薬：未結合オリゴマー上のAE標識を加水分解するための、600mMホウ酸、182.5mM NaOH、1%（v/v）オクトキシノール（TRITON（登録商標）X-100）、pH8.5~9.2。AE標識についての検出試薬は、検出試薬I：1mM硝酸および32mM H₂O₂、ならびに検出試薬II：1.5M NaOHである。（標的捕捉、等温増幅および検出反応の組成物および方法を記載している米国特許第5,283,174号、同第5,656,744号、同第5,658,737号、同第5,888,779号、同第6,110,678号、および同第10,196,674号も参照されたい）。

10

20

30

40

50

【0321】

増幅用オリゴおよび二重標識ヘアピン検出用プローブについてのオリゴスクリーニング実験を、リアルタイムTMA形式を使用してOEMプラットフォーム（Stratagene Mx3000）で行った。手短に述べると、T7プロモータープライマー／非T7プライマー／検出用プローブの組合せを含有する増幅試薬を、ウェルあたりの総体積が30μlのマルチウェルプレートに添加した。次いで、各ウェルに、10μl（40μlの総反応体積のために）のin vitro転写物標的核酸（配列番号2および／または3）を、反応あたり標的核酸の1×10⁷コピーでスパイクし、Mx3000を使用して5分間、60℃でインキュベートした。5分のインキュベーション後、試料を、4℃に設定したThermomixer加熱ブロックに全て移し、5分間インキュベートした。次いで、酵素試薬（10μl）を各反応ウェルに添加し、1,200RPMで混合しながらさらに1分間インキュベートした。混合ステップ後、試料をMx3000に戻し、リアルタイム増幅および検出反応を120分間行い、30秒ごとに蛍光発光読取値（Fam/Hexチャンネル）を得た。蛍光発光は、クエンチャーからの色素の分離を生じさせる結果となる、標的アンプリコンへの二重標識ヘアピン検出用プローブの結合を表す。蛍光曲線プロファイルを標的の増幅について分析した。

【0322】

最初の一連の実験で、T7プロモータープライマーと非T7プライマーと二重標識検出用プローブオリゴヌクレオチドの60との組合せを、すぐ上で説明したようにリアルタイムTMA増幅および検出反応で検査した。表7は、検査した様々なT7プロモータープライマーの配列および濃度を開示する。表8は、検査した様々な非T7プライマーの配列およ

び濃度を開示する。図 9 は、様々な二重標識ヘアピン検出用プローブ（トーチ）の配列および濃度を開示する。これらの反応混合物を各々単独で検査し、各組合せの成績を下の表 10 に T T i m e として記録した。組合せ条件を、R x n 成分 I D を使用して T 7 プロモータープライマー、非 T 7 プライマー、トーチの順序で提示する。

【表 7】

表7. T7プロモータープライマー。

Rxn 成分 ID	配列番号	ストックオリゴ濃度	最終濃度
1	62	35.93 pm/μL	0.2 pm/μL
2	61	17.24 pm/μL	0.2 pm/μL
3	60	53.16 pm/μL	0.2 pm/μL
4	59	46.51 pm/μL	0.2 pm/μL
5	58	72.11 pm/μL	0.2 pm/μL
6	57	47.63 pm/μL	0.2 pm/μL

10

【表 8】

表8:非T7プライマー。

Rxn 成分 ID	配列番号	ストックオリゴ濃度	最終濃度
a	12	221.25 pm/μL	0.4 pm/μL
b	21	227.75 pm/μL	0.4 pm/μL
c	18	223.75 pm/μL	0.4 pm/μL
d	19	212.75 pm/μL	0.4 pm/μL
e	20	216.75 pm/μL	0.4 pm/μL

20

【表 9】

表9:二重標識ヘアピン検出用プローブ。

Rxn 成分 ID	配列番号*	ストックオリゴ濃度	最終濃度
1	104	89 pm/μL	0.6 pm/μL
2	103	126 pm/μL	0.6 pm/μL

30

*プローブをフルオロフォアFAMおよびクエンチャーDabcylで標識した。

【表 10 - 1】

表10:各組合せ条件についてのTTime。組合せ条件を、表7のT7プロモータープライマー(最初の数字)、表8の非T7プライマー(文字)、および表9のプローブ(最後の数字)に従って標識する。

40

組合せ条件	TTime	組合せ条件	TTime
1a1	9.82	1a2	15.60
2a1	9.10	2a2	13.69
3a1	9.20	3a2	12.16

50

【表 10-2】

4a1	15.29	4a2	18.54
5a1	5.81	5a2	9.29
6a1	5.38	6a2	9.49
1b1	9.90	1b2	16.19
2b1	7.72	2b2	12.12
3b1	7.32	3b2	12.54
4b1	6.43	4b2	10.51
5b1	3.85	5b2	6.73
6b1	3.79	6b2	6.12
1c1	16.49	1c2	15.98
2c1	12.50	2c2	12.28
3c1	13.88	3c2	14.12
4c1	10.48	4c2	10.95
5c1	6.76	5c2	7.19
6c1	6.14	6c2	6.22
1d1	16.34	1d2	15.9
2d1	12.10	2d2	12.66
3d1	12.90	3d2	12.47
4d1	10.28	4d2	9.86
5d1	5.94	5d2	6.33
6d1	6.28	6d2	6.31
1e1	14.98	1e2	19.26
2e1	12.33	2e2	12.28
3e1	13.29	3e2	12.43
4e1	10.81	4e2	10.94
5e1	7.37	5e2	6.56
6e1	6.09	6e2	6.17

10

20

【0323】

この実験では、配列番号 57 または配列番号 58 を含む組合せが、一貫して速い T T i m e を示した。配列番号 57 または 58 のどちらかを T7 プロモーター提供体として使用し、配列番号 12、非 T7 プライマーを使用する組合せは、これらの同じ T7 プロモータープライマーを含有する組合せと比較して、より遅い T T i m e を示した。全ての組合せによって許容可能な成績が得られた。

30

【0324】

(実施例 6)

いくつかのプライマーとプローブの組合せの分析感度

この次の実施例では、いくつかの T7 プロモータープライマー（表 11）、単一の非 T7 プライマー（表 12）および単一のトーチ（表 13）のうちの 1 つを各々が含有するオリゴヌクレオチドの組合せを標的核酸の希釈物に対して検査してこれらの組合せの感度を測定した。反応混合物を上の実施例 5 について一般に説明したように用意し、反応を三連で実行した。標的核酸を、6.7 log コピーから 1.7 log コピーに至るまでの希釈物で検査した。

40

50

【表 1 1】

表11. T7プロモータープライマー。

Rxn 成分 ID	配列番号	ストックオリゴ濃度	最終濃度
2	61	17.24 pm/μL	0.2 pm/μL
4	59	46.51 pm/μL	0.2 pm/μL
5	58	72.11 pm/μL	0.2 pm/μL
6	57	47.63 pm/μL	0.2 pm/μL

10

【表 1 2】

表12.非T7プライマー。

Rxn 成分 ID	配列番号	ストックオリゴ濃度	最終濃度
b	21	227.75 pm/μL	0.4 pm/μL

【表 1 3】

表13.トーチ。

20

Rxn 成分 ID	配列番号*	ストックオリゴ濃度	最終濃度
1	104	89 pm/μL	0.15 pm/μL

*プローブをフルオロフォアとしての FAM およびクエンチャーとしての Dabcyl で標識した。

【0 3 2 5】

表 1 0 に提示し、表 1 0 について説明した R x n 成分 I D 形式を使用して、組合せ条件および検査の結果を下の表 1 4 に提示する。

30

40

50

【表 1 4】

表14.各組合せ条件についてのTTime。

log コピー	2b1	4b1	5b1	6b1
0.0	nd	nd	nd	nd
0.0	nd	nd	nd	nd
0.0	nd	nd	nd	nd
1.7	nd	24.78	13.04	13.24
1.7	nd	nd	14.26	13.51
1.7	nd	23.94	17.00	12.88
2.7	23.39	19.96	12.68	11.87
2.7	nd	19.82	11.83	12.37
2.7	nd	19.05	12.42	11.47
3.7	21.56	17.06	10.28	10.73
3.7	21.40	18.02	10.22	10.78
3.7	21.10	18.37	11.23	12.86
4.7	16.32	14.45	9.81	9.26
4.7	16.32	15.13	9.45	9.08
4.7	16.27	15.48	9.59	9.30
5.7	14.18	12.50	8.30	7.85
5.7	13.59	12.42	7.88	7.72
5.7	13.75	12.42	8.14	7.78
6.7	15.04	11.40	6.82	6.72
6.7	12.86	11.45	6.70	6.67
6.7	12.61	11.13	7.06	6.65

ndは、読み取り可能なTTimeをもたらさなかったアッセイ条件を表す

10

20

30

40

50

【0 3 2 6】

この実験では、全ての組合せが良好な感度を示し、組合せ5 b 1および6 b 1は、1反応あたり標的核酸の1.70 log コピーに至るまでの良好な感度を示した。別の実験（示さない）では、組合せ6 b 1を本実施例で説明するように用意して実行したが、P a n t h e r 機器で行った。別の実験では、組合せ6 b 1は、1反応あたり標的核酸の5コピーに至るまでの感度を示した。

【0 3 2 7】

さらなる感度実験では、0.2 pm/μLの配列番号57をプロモータープライマーとして、0.15 pm/μLの配列番号104をトーチとして、および0.4 pm/μLの配列番号12、21、18または20のうちの1つを非T7プライマーとして含有するいくつかの組合せを、感度についてさらに検査した。反応を上で一般に説明したように設定し、各条件を三連で実行した。表10からの組合せ条件指標をデータ表で使用する（表15は、三連反応の平均TTimeを示す）。

【表 1 5】

表15.感度実験の平均TTime。

log コピー	6a1	6b1	6c1	6e1
0	nd	nd	nd	nd
1.69	15.17	14.29	nd	14.57
2.69	11.92	11.60	nd	11.79
3.69	11.22	9.97	18.63	11.29
4.69	9.52	9.39	14.92	9.00
5.69	7.72	7.49	12.80	7.54
6.69	6.36	6.66	11.55	6.74

ndは、読み取り可能なTTimeをもたらさなかったアッセイ条件を表す

これらのデータは、組合せ 6 a 1、6 b 1、6 c 1 および 6 e 1 の各々が良好な感度を有し、1 反応あたり 1.7 log もの少ないコピーの検出を示すものもあることを示す。

【0329】

(実施例 7)

異なる組合せのプライマーおよびプローブを使用する SARS-CoV-2 の等温増幅およびリアルタイム検出。

T7 プロモータープライマーと非 T7 プライマーと二重標識検出用プローブオリゴヌクレオチドとの 60 のさらなる組合せを、実施例 5 で説明したようにリアルタイム TMA 増幅および検出反応で検査した。表 16 は、検査した様々な T7 プロモータープライマーの配列および濃度を開示する。表 17 は、検査した様々な非 T7 プライマーの配列および濃度を開示する。そして図 18 は、様々な二重標識ヘアピン検出用プローブ（トーチ）の配列および濃度を開示する。これらの反応混合物を各々単独で検査し、各組合せの成績を表 19 に T Time として記録した。組合せ条件を、Rxn 成分 ID を使用して T7 プロモータープライマー、非 T7 プライマー、トーチの順序で提示する。

【表 16】

表16. T7プロモータープライマー。

Rxn 成分 ID	配列番号	ストックオリゴ濃度	最終濃度
1	70	60.68 pm/μL	0.2 pm/μL
2	78	58.93 pm/μL	0.2 pm/μL
3	64	61.12 pm/μL	0.2 pm/μL
4	63	48.79 pm/μL	0.2 pm/μL
5	66	47.00 pm/μL	0.2 pm/μL
6	65	70.00 pm/μL	0.2 pm/μL

【表 17】

表17.非T7プライマー。

Rxn 成分 ID	配列番号	ストックオリゴ濃度	最終濃度
a	22	225.75 pm/μL	0.4 pm/μL
b	15	88.25 pm/μL	0.4 pm/μL
c	23	205.75 pm/μL	0.4 pm/μL
d	24	197.00 pm/μL	0.4 pm/μL
e	25	149.00 pm/μL	0.4 pm/μL

【表 18】

表18.二重標識ヘアピン検出用プローブ。

Rxn 成分 ID	配列番号*	ストックオリゴ濃度	最終濃度
1	106	84.31 pm/μL	0.6 pm/μL
2	105	87.16 pm/μL	0.6 pm/μL

*プローブをフルオロフォアFAMおよびクエンチャーDabcylで標識した。

【0330】

上の表 16 ~ 18 からの T7 プロモータープライマー、非 T7 プライマーおよびトーチ成分の各々を組み合わせ、検査した。組合せ条件を、Rxn 成分 ID を使用して T7 プロ

モータープライマー、非 T 7 プライマー、トーチの順序で表 19 に提示する。

【表 19 - 1】

表19.各組合せ条件についてのTTime。組合せ条件を、表16のT7プロモータープライマー(最初の数字)、表17の非T7プライマー(文字)、および表18のプロープ(最後の数字)に従って標識する。

組合せ条件	TTime	組合せ条件	TTime
1a1	8.92	1a2	9.27
2a1	7.07	2a2	7.66
3a1	nd	3a2	nd
4a1	12.29	4a2	11.99
5a1	nd	5a2	nd
6a1	11.49	6a2	11.50
1b1	8.84	1b2	8.67
2b1	6.89	2b2	6.98
3b1	nd	3b2	nd
4b1	nd	4b2	nd
5b1	nd	5b2	nd
6b1	12.88	6b2	10.74
1c1	8.38	1c2	8.11
2c1	6.22	2c2	6.53
3c1	nd	3c2	*
4c1	11.46	4c2	11.30

10

20

【表 19 - 2】

5c1	nd	5c2	nd
6c1	nd	6c2	nd
1d1	7.74	1d2	8.23
2d1	6.21	2d2	6.90
3d1	nd	3d2	nd
4d1	11.96	4d2	12.63
5d1	nd	5d2	nd
6d1	nd	6d2	nd
1e1	7.73	1e2	8.19
2e1	6.35	2e2	6.97
3e1	nd	3e2	nd
4e1	11.64	4e2	12.44
5e1	nd	5e2	nd
6e1	12.49	6e2	12.07

30

ndは、読み取り可能なTTimeをもたらさなかったアッセイ条件を表す

*組合せ条件3c2についてのTTimeは、非常に低く、シグモイド勾配ではなく線形勾配を有し、したがって、偽陽性結果を示す可能性が高かった。

40

【0331】

この実験では、配列番号70、配列番号78または配列番号24を含む組合せが、一貫して速いTTimeを示した。組合せ条件3c2を除いて、TTimeを提示した組合せの全てによって良好な成績が得られた。

【0332】

(実施例8)

いくつかのプライマーとプロープの組合せの分析感度

いくつかのT7プロモータープライマー(表20)、単一の非T7プライマー(表21)および単一の検出用プロープ(表22)のうちの1つを各々が含有するオリゴヌクレオ

50

チドの組合せを標的核酸の希釈物に対して検査してこれらの組合せの感度を測定した。反応混合物を実施例 5 について一般に説明したように用意し、反応を三連で実行した。

【表 2 0】

表20. T7プロモータープライマー。

Rxn 成分 ID	配列番号	ストックオリゴ濃度	最終濃度
1	70	60.68 pm/μL	0.2 pm/μL
2	78	58.93 pm/μL	0.2 pm/μL
4	63	48.79 pm/μL	0.2 pm/μL
6	65	70.00 pm/μL	0.2 pm/μL

10

【表 2 1】

表21.非T7プライマー。

Rxn 成分 ID	配列番号	ストックオリゴ濃度	最終濃度
d	24	197.00 pm/μL	0.4 pm/μL

20

【表 2 2】

表22.トーチ。

Rxn 成分 ID	配列番号*	ストックオリゴ濃度	最終濃度
1	106	84.31 pm/μL	0.6 pm/μL

*プローブをフルオロフォアとしてのFAMおよびクエンチャーとしてのDabcylで標識した。

【0 3 3 3】

組合せ条件および検査結果を、表 1 9 について説明したことの中で提示した R x n 成分 I D 形式を使用して表 2 3 に提示する。

30

40

50

【表 2 3】

表23.感度実験のTTime。

log コピー	1d1	2d1	3d1または4d1	6d1
0.0	nd	nd	nd	nd
0.0	nd	nd	nd	nd
0.0	nd	nd	nd	nd
1.7	nd	nd	nd	nd
1.7	nd	nd	nd	nd
1.7	nd	nd	nd	nd
2.7	18.69	13.00	nd	nd
2.7	18.56	13.26	nd	nd
2.7	19.30	nd	nd	nd
3.7	15.14	10.89	19.81	nd
3.7	15.08	10.03	20.33	nd
3.7	15.49	10.31	20.07	nd
4.7	12.10	8.72	15.87	nd
4.7	12.40	8.73	15.29	nd
4.7	13.33	8.73	15.19	nd
5.7	9.51	7.31	12.80	nd
5.7	8.94	7.13	12.61	nd
5.7	9.53	7.14	13.62	nd
6.7	8.06	6.29	11.03	nd
6.7	8.03	6.06	10.38	nd
6.7	8.42	6.13	10.56	nd

ndは、読み取り可能なTTimeをもたらしなかったアッセイ条件を表す

【0 3 3 4】

この実験では、組合せ1 d 1、2 d 1および4 d 1は、1反応あたり標的核酸の3.7 log コピーまでの良好な感度を示し、組合せ1 d 1および2 d 1は、1反応あたり2.7 log コピーに至るまでの良好な感度を示した。組合せ6 d 1は、この実験では反応性でなかった。

【0 3 3 5】

さらなる感度実験では、0.2 pm/μLの配列番号78をプロモータープライマーとして、0.15 pm/μLの配列番号106をトーチとして、および0.4 pm/μLの配列番号15、23、24または25のうちの1つを非T7プライマーとして含有するいくつかの組合せを、感度についてさらに検査した。反応をすぐ上で一般に説明したように設定し、各組合せを三連で実行した。表19からの組合せ条件指標をデータ表で使用する（表24：三連反応についての平均TTimeを示す）。

【表 2 4】

表24.感度実験の平均TTime。

log コピー	2b1	2c1	2d1	2e1
0	nd	nd	nd	nd
1.69	nd	nd	nd	nd
2.69	nd	12.81	12.96	14.50
3.69	11.68	10.36	10.55	10.82
4.69	9.25	8.72	8.92	8.92
5.69	7.49	7.16	7.28	7.44
6.69	6.21	6.05	6.01	6.18

ndは、読み取り可能なTTimeをもたらしなかったアッセイ条件を表す

10

20

30

40

50

【0336】

これらのデータは、1反応あたり2.7logもの少ないコピーの検出を示すものもある、良好な感度を有するためのこれらの組合せを示す。

【0337】

(実施例9)

SARS-CoV-2の2つの領域を標的とする、プライマーとプローブの組合せを有するマルチプレックス製剤

コロナウイルス標的核酸の2つの領域を標的とするマルチプレックス、リアルタイム増幅および検出反応を行うための反応混合物における、いくつかのオリゴマーの組合せを調製した。これらの反応混合物は、配列番号57および配列番号70で示される配列を有するT7プロモータープライマーと、配列番号21および配列番号24で示される配列を有する非T7プライマーと、配列番号104で示される配列を有する検出用プローブ（フルオロフォアとしてのFAMおよびクエンチャーとしてのDabcylで標識した）および配列番号106で示される配列を有する検出用プローブ（フルオロフォアとしてのHEXおよびクエンチャーとしてのDabcylで標識した）とを含んだ。様々な組合せの各々では、配列番号70のT7プロモータープライマーを、0.1pm/μL、0.2pm/μL、または0.3pm/μLのいずれかで反応混合物に含めたが、他のオリゴマー成分を同じ濃度（配列番号57については0.2pm/μL、配列番号21については0.4pm/μL、配列番号24については0.4pm/μL、配列番号104については0.15pm/μL、および配列番号106については0.15pm/μL）で提供した。他の点では、実施例5で一般に説明したように反応を設定し、実行した。結果を表25に示し、配列番号70の濃度によって異なる組合せに関して言及する。

【表25-1】

表25.マルチプレックス反応のTTimeデータ。

log コピー	0.1 pm/μL	配列番号 70	0.2 pm/μL	配列番号 70	0.3 pm/μL	配列番号 70
	領域 1 FAM チャンネル	領域 2 HEX チャンネル	領域 1 FAM チャンネル	領域 2 HEX チャンネル	領域 1 FAM チャンネル	領域 2 HEX チャンネル
0.00	nd	nd	nd	nd	nd	nd
0.00	nd	nd	nd	nd	nd	nd
0.00	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1.69	16.25	nd	16.01	nd	nd	nd
1.69	16.84	nd	15.23	nd	nd	nd
1.69	16.81	nd	14.83	nd	nd	nd
2.69	12.10	nd	13.31	nd	14.63	nd
2.69	12.45	nd	12.65	nd	14.18	nd
2.69	12.25	nd	13.41	nd	13.88	nd

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 2】

3.69	10.90	nd	10.57	18.25	11.29	17.94
3.69	10.49	nd	10.65	18.31	10.69	16.46
3.69	10.46	nd	10.98	18.21	10.63	17.17
4.69	9.10	16.24	9.67	14.33	9.13	12.13
4.69	9.43	15.11	9.14	13.42	8.93	12.21
4.69	9.77	17.67	9.45	13.95	9.71	13.19
5.69	7.76	9.24	7.78	10.09	8.25	9.80
5.69	7.59	12.44	8.19	10.46	8.20	9.75
5.69	7.74	12.67	8.24	10.55	8.18	9.72
6.69	6.93	8.05	6.74	8.00	7.20	7.84
6.69	6.71	9.72	6.78	7.97	6.73	7.24
6.69	6.78	9.82	6.82	8.11	7.34	7.95

ndは、読み取り可能なTTimeをもたさなかったアッセイ条件を表す

【0 3 3 8】

本実施例では、 $0.2 \text{ pm}/\mu\text{L}$ の配列番号70を有するマルチプレックス組合せは、FAMチャンネルでは 1.7 log コピーに至るまでおよびHEXチャンネルでは 3.7 log コピーに至るまで検出される、最もロバストな成績を示した。全ての組合せが良好に動作し、三連条件について一貫したTTimeを提供した。

【0 3 3 9】

(実施例10)

シングルプレックス反応およびマルチプレックス反応で標的捕捉用オリゴヌクレオチドとプライマーとプローブの組合せを使用する分析感度テスト。

2つのオリゴマー組合せを、コロナウイルス標的核酸の2つの領域を標的とするシングルプレックス型およびマルチプレックス型、標的捕捉、増幅および終点検出反応を行うために調製した。コロナウイルス標的核酸の2つの領域は、配列番号2および3で示される配列を有するIVTによって表される。試料輸送培地を希釈剤として使用して、配列番号2のストック濃度(2.4×10^{15} コピー/mL)および配列番号3のストック濃度(1.5×10^{15} コピー/mL)を、各々、300、100、30、10、3および1コピー/mLへと段階希釈した。陰性対照は、IVTを有さない試料輸送培地であった。標的捕捉用オリゴヌクレオチド、プライマーオリゴヌクレオチドおよびプローブオリゴヌクレオチドを表26に示す。検出用プローブオリゴをアクリジニウムエステル(AE)で標識した。陰性対照を反応プレートの5つのウェルに添加した。シングルプレックス反応については各IVTの各希釈物も反応プレートに5の倍数単位で添加した。マルチプレックス反応については2つのIVTの組み合わせた希釈物を反応プレートに5の倍数単位で添加した。各反応を総体積100 μL で行った。次いで、標的捕捉反応を行い、捕捉された試料を、等温増幅および検出のために別々のウェルに溶出した。Hologic, IncからのPantHER機器を使用してアッセイを行った。結果を表27に示す。

10

20

30

40

50

【表 2 6】

表26:コロナウイルス標的捕捉用オリゴヌクレオチド、T7プロモータープライマー、非T7プライマー、および検出用プローブ。

オリゴのタイプ	配列番号	ストックオリゴ濃度	最終濃度
TCO	92	588.00 mg/L	0.5 mg/L
T7	57	47.63 pm/ μ L	0.2 pm/ μ L
非 T7	21	227.75 pm/ μ L	0.4 pm/ μ L
プローブ	36	20419941 RLU/ μ L	6700 RLU/ μ L
TCO	96	908.00 mg/L	0.5 mg/L
T7	78	58.93 pm/ μ L	0.2 pm/ μ L
非 T7	24	197.00 pm/ μ L	0.4 pm/ μ L
プローブ	45	3548884 RLU/ μ L	5700 RLU/ μ L

10

20

30

40

50

【表 2 7】

表27.各シングルプレックスおよびマルチプレックス条件についてのRLU。

配列番号2	RLU (1,000秒単位)	結果	配列番号3	RLU (1,000秒単位)	結果	配列番号2および3	RLU (1,000秒単位)	結果
300	405	陽性	300	378	陽性	300	779	陽性
300	412	陽性	300	385	陽性	300	785	陽性
300	415	陽性	300	388	陽性	300	785	陽性
300	406	陽性	300	395	陽性	300	804	陽性
300	405	陽性	300	392	陽性	300	779	陽性
100	402	陽性	100	383	陽性	100	775	陽性
100	413	陽性	100	387	陽性	100	779	陽性
100	404	陽性	100	381	陽性	100	805	陽性
100	411	陽性	100	384	陽性	100	793	陽性
100	400	陽性	100	379	陽性	100	783	陽性
30	393	陽性	30	341	陽性	30	703	陽性
30	395	陽性	30	285	陽性	30	756	陽性
30	404	陽性	30	303	陽性	30	781	陽性
30	363	陽性	30	291	陽性	30	732	陽性
30	367	陽性	30	347	陽性	30	698	陽性
10	275	陽性	10	158	陽性	10	488	陽性
10	398	陽性	10	311	陽性	10	379	陽性
10	317	陽性	10	43	陰性	10	610	陽性
10	6	陰性	10	352	陽性	10	781	陽性
10	315	陽性	10	334	陽性	10	736	陽性
3	371	陽性	3	76	同等	3	272	陽性
3	19	陰性	3	136	同等	3	235	陽性
3	27	陰性	3	324	陽性	3	128	同等
3	6	陰性	3	234	陽性	3	331	陽性
3	62	同等	3	223	陽性	3	65	同等
1	7	陰性	1	13	陰性	1	625	陽性
1	7	陰性	1	42	陰性	1	389	陽性
1	8	陰性	1	6	陰性	1	183	陽性
1	6	陰性	1	71	同等	1	119	同等
1	6	陰性	1	56	陰性	1	27	陰性

【0340】

この実験の結果は、30コピー／mLではシングルプレックスおよびマルチプレックス条件について100%陽性で、コロナウイルス標的核酸の両方の領域に対して同等の感度、10コピー／mLではシングルプレックス条件について80%陽性およびマルチプレックス条件について100%陽性、ならびにシングルプレックス条件のうちの1つについては3コピー／mLでおよびマルチプレックス条件については1コピー／mLで60%陽性を示した。陰性反応ウェルは、偽陽性を示さなかった。反応曲線は、良好な動態を示した。

【0341】

10

20

30

40

50

(実施例 11)

微生物交差反応性および干渉テスト

この実験の目的は、表 28 のプライマーとプローブの組合せが、遺伝的に近縁のまたは遭遇することが多い微生物と交差反応しないことを実証することであった。加えて、この実験は、評価した微生物が、表 28 のプライマーとプローブの組合せの SARS-CoV-2 を検出する能力に干渉しないことを実証した。表 29 に収載する様々な微生物を、1 : 1.56 の STM 比で加工したプールされた臨床的鼻咽頭 (NP) スwab において、0.03 TCID₅₀ / mL (3 × LOD) でスパイクした SARS-CoV-2 不活性化培養ウイルス (BEI Resources, Manassas, VA; カタログ番号 NR-52281) の存在および非存在下で検査した。表 29 に収載する微生物のストック濃度を試料輸送培地で希釈して標的濃度 (表 30 を参照されたい) を得た。実施例 10 で一般に説明したようにアッセイを設定し、行った。

10

【表 28】

表28.プライマーおよびプローブ。

オリゴのタイプ	配列番号
T7 プライマー	57
非 T7 プライマー	21
検出用プローブ	36
T7 プライマー	78
非 T7 プライマー	24
検出用プローブ	45

20

【表 29 - 1】

表29.微生物(別段の指示がない限り、微生物は、Hologic,Incで収集された試料からのものであったか、またはHologic,Incにより合成された*in vitro*転写物によって表した)

同じ遺伝子ファミリーに由来する微生物		循環微生物	
ヒトコロナウイルス 229E 型	ATCC、Manassas、VA; カタログ番号 VR-740	アデノウイルス 1 型	ZeptoMetrix、Buffalo、NY; カタログ番号 0810050CF
ヒトコロナウイルス OC43 型	ZeptoMetrix、Buffalo、NY; カタログ番号 0810024CF (HCT-8 株)	ヒトメタニューモウイルス (hMPV)	ZeptoMetrix、Buffalo、NY; カタログ番号 0810160CF (IA3-2002 株)
ヒトコロナウイルス HKU1 型		パラインフルエンザウイルス 1~4 型	ZeptoMetrix、Buffalo、NY; カタログ番号 0810014CF、0810015CF、0810016CF、および 0810060CF

30

40

50

【表 29 - 2】

ヒトコロナウイルス NL63 型	ZeptoMetrix、Buffalo、NY; カタログ番号 0810228CF (ペロ株)	インフルエンザ A 型	ZeptoMetrix、Buffalo、 NY:カタログ番号 0810514CF (ノルウェー /466/2014)	
SARS-コロナウ イルス		インフルエンザ B 型	ZeptoMetrix、Buffalo、 NY:カタログ番号 08100253CF (フロリダ /04/06)	
MERS-コロナウ イルス	BEI Resources、 Manassas、VA;分離株 EMC/1012	エンテロウイルス(例えば、 EV68)	ZeptoMetrix、Buffalo、 NY:カタログ番号 0810236CF (分離株 200E)	10
		呼吸器合胞体ウイルス	ZeptoMetrix、Buffalo、 NY:カタログ番号 0810040ACF (分離株 2006)	
		ライノウイルス B14 型	ZeptoMetrix、Buffalo、 NY:カタログ番号 0810023CFN	
		<i>Chlamydia pneumonia</i>	ATCC、Manassas、VA;カ タログ番号 70019109 (2023 株)	20
		<i>Haemophilus influenzae</i>		
		<i>Legionella pneumophila</i>		
		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ZeptoMetrix、Buffalo、 NY:カタログ番号 801660 (H37Ra-1 株)	
		<i>Streptococcus pneumonia</i>		
		<i>Streptococcus pyogenes</i>		
		<i>Bordetella pertussis</i>		
		<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		
		<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)		30
		<i>Candida albicans</i>		
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
		<i>Streptococcus salivarius</i>		
		ヒトの気道における多様な 微生物叢を表すための、個 体から収集した、SARS- CoV-2 の検査で陰性であ る、30 の臨床 NP スwab 検 体		40

【表 3 0】

表30.検査した微生物の反応濃度

微小生物	単位	標的濃度
ヒトコロナウイルス 229E 型	TCID50/mL	1.00E+05
ヒトコロナウイルス OC43 型	TCID50/mL	1.00E+05
ヒトコロナウイルス HKU1 型	c/mL	1.00E+06
ヒトコロナウイルス NL63 型	TCID50/mL	5.00E+02
SARS-コロナウイルス	c/mL	1.00E+06
MERS-コロナウイルス	TCID50/mL	1.00E+04
アデノウイルス 1 型	TCID50/mL	1.00E+05
ヒトメタニューモウイルス(hMPV)	TCID50/mL	1.00E+06
パラインフルエンザウイルス 1 型	TCID50/mL	1.00E+05
パラインフルエンザウイルス 2 型	TCID50/mL	1.00E+05
パラインフルエンザウイルス 3 型	TCID50/mL	1.00E+05
パラインフルエンザウイルス 4 型	TCID50/mL	1.00E+03
インフルエンザ A 型(H3N2)	TCID50/mL	1.00E+05
インフルエンザ B 型	TCID50/mL	2.00E+03
エンテロウイルス(例えば、EV68)	TCID50/mL	1.00E+05
呼吸器合胞体ウイルス	TCID50/mL	1.00E+05
ライノウイルス	TCID50/mL	1.00E+04
<i>Chlamydia pneumonia</i>	IFU/mL	1.00E+06
<i>Haemophilus influenzae</i>	CFU/mL	1.00E+06
<i>Legionella pneumophila</i>	CFU/mL	1.00E+06
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	TCID50/mL	1.00E+06
<i>Streptococcus pneumonia</i>	CFU/mL	1.00E+06
<i>Streptococcus pyrogenes</i>	CFU/mL	1.00E+06
<i>Bordetella pertussis</i>	CFU/mL	1.00E+06
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	CFU/mL	1.00E+06
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)		1.00E+06

【 0 3 4 2】

実施例 10 で一般に説明したようにアッセイを設定し、行った。SARS-CoV-2 標的核酸の第 1 の領域について手短に述べると、標的捕捉試薬を、標的捕捉用オリゴヌクレオチド (0.666 mg/L の配列番号 92) を含有するように調製し、増幅試薬を、T7 プライマー (0.1 pmol/μL の配列番号 57) および非 T7 プライマー (0.2 pmol/μL の配列番号 21) を含有するように調製した、ならびに AE 標識検出用プローブ (5E3 RLU/μL の配列番号 36) を含有する検出ハイブリダイゼーション試薬。同様に、SARS-CoV-2 標的核酸の第 2 の領域については、標的捕捉用オリゴヌクレオチド (0.666 mg/L の配列番号 96)、増幅試薬を、T7 プライマー (0.1 pmol/μL の配列番号 78) および非 T7 プライマー (0.2 pmol/μL の配列番号 24) を含有するように調製した、ならびに AE 標識検出用プローブ (5E3 RLU/μL の配列番号 45) を含有する検出ハイブリダイゼーション試薬。核酸内部対照系も、標的捕捉用オリゴヌクレオチド (標的捕捉試薬中の 0.5 mg/L の配列番号 10)、T7 プライマー (増幅試薬中の 0.2 pmol/μL の配列番号 6)、非 T7 プライマー (増幅試薬中の 0.4 pmol/μL の配列番号 7)、および AE 標識検出用プローブオリゴヌクレオチド (4E3 GLU/μL の配列番号 8) を含有するように調製した。反応における任意の標的からのシグナルが、内部対照プローブの、より遅い、より長く続く、より低強度のグローワーシグナルで測定されるよりも迅速に消光し、高い強

度を有する、フラッシャー／グローワー検出用プローブを使用して、標的シグナルを内部対照シグナルと区別した。全ての試料を三連で Panther 機器（Hologic, Inc.）で行った。結果を表 31 に提示する。

【表 31】

表31.交差反応性および干渉テスト結果。

微生物	スパイクしていない SARS-CoV-2				スパイクした SARS-CoV-2			
	検査数	有効数	検出数	検出%	検査数	有効数	検出数	検出%
生物対照なし	3	3	0	0	3	3	3	100
ヒトコロナウイルス 229E 型	3	3	0	0	3	3	3	100
ヒトコロナウイルス OC43 型	3	3	0	0	3	3	3	100
ヒトコロナウイルス HKU1 型	3	3	0	0	3	3	3	100
ヒトコロナウイルス NL63 型	3	3	0	0	3	3	3	100
SARS-コロナウイルス	3	3	0	0	3	3	3	100
MERS-コロナウイルス	3	3	0	0	3	3	3	100
アデノウイルス 1 型	3	3	0	0	3	3	3	100
ヒトメタニューモウイルス	3	3	0	0	3	3	3	100
パラインフルエンザウイルス 1 型	3	3	0	0	3	3	3	100
パラインフルエンザウイルス 2 型	3	3	0	0	3	3	3	100
パラインフルエンザウイルス 3 型	3	3	0	0	3	3	3	100
パラインフルエンザウイルス 4 型	3	3	0	0	3	3	3	100
インフルエンザ A 型(H3N2)	3	3	0	0	3	3	3	100
インフルエンザ B 型	3	3	0	0	3	3	3	100
エンテロウイルス(例えば、EV68)	3	3	0	0	3	3	3	100
呼吸器合胞体ウイルス	3	3	0	0	3	3	3	100
ライノウイルス	3	3	0	0	3	3	3	100
<i>Chlamydia pneumonia</i>	3	3	0	0	3	3	3	100
<i>Haemophilus influenzae</i>	3	3	0	0	3	3	3	100
<i>Legionella pneumophila</i>	3	3	0	0	3	3	3	100
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3	3	0	0	3	3	3	100
<i>Streptococcus pneumonia</i>	3	3	0	0	3	3	3	100
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3	3	0	0	3	3	3	100
<i>Bordetella pertussis</i>	3	3	0	0	3	3	3	100
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	3	3	0	0	3	3	3	100
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	3	3	0	0	3	3	3	100
<i>Candida albicans</i>	3	3	0	0	3	3	3	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	3	0	0	3	3	3	100
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	3	0	0	3	3	3	100
<i>Streptococcus salivarius</i>	3	3	0	0	3	3	3	100
陰性臨床 NP スwab 検体	90	90	0	0	90	90	90	100

【0343】

本実施例は、SARS-CoV-2 標的核酸がない全てのチャレンジ微生物反応について陰性結果を示した（全ての内部対照は、これらの反応で陽性を示した）。本実施例はまた、これらのチャレンジ生物の存在下でアッセイしたとき、SARS-CoV-2 の検出について 100% 陽性を示した。したがって、プライマーおよびプローブは、遺伝的に近縁の微生物および遭遇することが多い鼻咽頭微生物と交差反応しない。また、遺伝的に近

縁の微生物および遭遇することが多い鼻咽頭微生物は、プライマーおよびプローブを使用するSARS-CoV-2標的核酸の検出に干渉しない。

【0344】

(実施例12)

PCRアッセイおよび等温アッセイの臨床成績

PCRアッセイおよび等温アッセイの臨床成績を、残存臨床検体のパネルを使用して決定した。実験のために、105の残存臨床鼻咽頭検体を、呼吸器感染症の徴候および症状を有する米国人患者から収集した。PCRアッセイは、実施例2で説明したように設定し、一般的に行った。等温アッセイは、実施例11で一般に説明したように設定し、行った。PCRプライマーおよびプローブは、配列番号12～17であった（PCR内部対照は、配列番号4、5および9であった）。等温プライマーおよびプローブは、配列番号21、24、36、45、57および78であった（等温内部対照は、配列番号6、7、8および10であった）。アッセイを、Panther Fusion機器、1アッセイあたり1残存臨床試料につき1回反復で行った。結果を表32に示す。

10

【表32】

表32.臨床成績

		SARS-CoV-2 PCR 結果		合計
		陽性	陰性	
SARS-CoV-2 TMA 結果	陽性	50	1	51
	陰性	0	54	54
	合計	50	55	105

20

【0345】

これらのアッセイは、これらの105の臨床残存試料に関して、99.0%の全体一致、100%の正の一致、および98.2%の負の一致を示した。

【0346】

(実施例13)

プール臨床試料におけるPCRアッセイおよび等温アッセイの臨床成績

30

PCRアッセイおよび等温アッセイの各々を、5つの試料のプールにおいてたった1つの陽性臨床試料を検出するそれらの能力について検査した。325の個別の鼻咽頭（NP）臨床試料を、鼻咽頭スワブ、鼻腔スワブまたは中咽頭スワブを使用して収集し、3mLのウイルス輸送培地またはユニバーサル輸送培地に製造業者の使用説明書に従って配置した。これらの臨床試料を個別にアッセイして、各試料中のSARS-CoV-2の存在または非存在を決定した。個別のテスト結果を使用して試料をプールして、45の陽性プール試料および20の陰性プール試料を作製した。陽性プール試料は、4つの陰性個別試料と組み合わせた1つの陽性個別試料であった。陰性プール試料は、5つの陰性個別試料の組合せであった。100μLの5つの個別試料各々を、780μLの試料輸送媒地に混ぜ入れて1.280mLのプール試料体積にした。各陽性および陰性プールからの1つの反復試料をPCRアッセイで検査し、各陽性および陰性プールからの1つの反復試料を等温アッセイで検査した。表1および26で開示したオリゴヌクレオチド、ならびに配列番号4～10における内部対照オリゴヌクレオチドを使用して、上で一般に説明したようにアッセイを行った。Panther Fusion機器を使用して、アッセイを行った。結果がPCR反応についてはCtおよび等温増幅アッセイについてはkRLUとして提示され、それが表33～34に要約される。

40

50

【表 3 3】

表 33. PCR アッセイ Ct 要約統計量。

				PCR 結果					
タイプ	タイプ	検査数	分析数	平均 CoV Ct	標準偏 差 CoV Ct	CV CoV Ct	平均 IC Ct	標準偏 差 IC Ct	CV IC Ct
陰性	プール	20	20	—	—	—	30.49	0.44	1.4%
	個別	280	279*	—	—	—	30.38	0.39	1.3%
陽性	プール	45	43**	28.47	4.48	15.7%	30.28	0.27	0.9%
	個別	45	44***	26.61	4.66	17.5%	30.47	0.56	1.8%

*1 つの擬陽性を計算から除いた(同じ試料が擬陽性等温アッセイ結果を示した)

**2 つの予想陽性プールが PCR アッセイで陰性結果を示した。これらのプールからの IC 結果を計算から除外した

**1 つの無効値を計算から除外した

【表 3 4】

表 34.等温アッセイ kRLU 要約統計量。

				Aptima 結果		
タイプ	タイプ	検査数	分析数	平均 kRLU	標準偏差 kRLU	CV kRLU
陰性	プール	20	20	273	7	2.5%
	個別	280	270*	270	11	4.0%
陽性	プール	45	45	1,137	99	8.7%
	個別	45	45	1,147	68	5.9%

*1 つの擬陽性を計算から除外した(同じ試料が擬陽性 PCR 結果を示した)

*9 つの無効値を計算から除外した

【0 3 4 7】

プール結果を予想結果に対して分析して、一致率を算出した。結果を分析して、異なる低陽性有病率を有する集団内のアッセイ成績を示した。低陽性有病率は、31,000の個別の検査結果を収集すること、そしてこれらの結果についてのCt分布を決定することによって、決定した。Ct結果を四分位に分割し、Ct分布に基づいて、試料が34（全陽性試料の11.1%）より高いCt値を有した場合、低陽性と決定した。表35および表36は、11.1%の低陽性有病率（5／45）を有する集団における等温増幅アッセイおよびPCRアッセイの陽性一致率（PPA）および陰性一致率（NPA）をそれぞれ示す。等温増幅アッセイは、100%（92.1～100）のPPAを有し、PCRアッセイは、95.6%（85.2～98.8）のPPAを有した。両方のアッセイが100%（83.9～100）のNPAを有した。

【表 3 5】

表 35. 11.1%低陽性有病率についての等温 PPA/NPA。

		予想結果		合計		一致	95% C.I.
プール 結果		陽性	陰性				
	陽性	45	0	45	陽性一致率	100.0%	(92.1% - 100.0%)
	陰性	0	20	20	陰性一致率	100.0%	(83.9% - 100.0%)
合計		45	20	65	全体一致	100.0%	(94.4% - 100.0%)

10

20

30

40

50

【表 3 6】

表 36. 11.1%低陽性有病率についての PCR PPA/NPA。

		予想結果		合計		一致	95% C.I.
		陽性	陰性				
プール 結果	陽性	43	0	43	陽性一致率	95.6%	(85.2% - 98.8%)
	陰性	2	20	22	陰性一致率	100.0%	(83.9% - 100%)
	合計	45	20	65	全体一致	96.9%	(89.5% - 99.2%)

10

【0 3 4 8】

表 3 7 および表 3 8 は、25%の低陽性有病率（5 / 20）を有する集団における等温増幅アッセイおよび PCR アッセイの PPA および NPA をそれぞれ示す。等温アッセイは、100%（83.9 ~ 100）の PPA を有し、PCR アッセイは、90.0%（69.9 ~ 97.2）の PPA を有した。両方のアッセイは、100%（83.9 ~ 100）の NPA を有した。

【表 3 7】

表 37: 25%低陽性有病率についての等温 PPA/NPA。

		予想結果		合計		一致	95% C.I.
		陽性	陰性				
プール 結果	陽性	20	0	20	陽性一致率	100.0%	(83.9% - 100%)
	陰性	0	20	20	陰性一致率	100.0%	(83.9% - 100%)
	合計	20	20	40	全体一致	100.0%	(91.2% - 100%)

20

【表 3 8】

表 38. 25%低陽性有病率についての PCR PPA/NPA。

		予想結果		合計		一致	95% C.I.
		陽性	陰性				
プール 結果	陽性	18	0	18	陽性一致率	90.0%	(69.9% - 97.2%)
	陰性	2	20	22	陰性一致率	100.0%	(83.9% - 100%)
	合計	20	20	40	全体一致	95.0%	(83.5% - 98.6%)

30

【0 3 4 9】

等温アッセイおよび PCR アッセイの両方が、25%ほどもの高い低陽性有病率を有する集団において得られた個別試料からのプールについての予想結果に対して90%より高い PPA を示した。加えて、両方のアッセイが、少なくとも99%の NPA を示した。

40

【表 3 9 - 1】

表39.配列。

配列 番号	配列 (5' → 3')	説明
1	GENBANK 受託番号 MT106054.1	SARS-CoV-2 参照配列
2	GGGCGAAUUGGGUACCGGGCCCCCCCUCGAGGUCGACGGUAUCGA UAAGCUUGAUUUCGAAUCCUGCAGCCCGGGGAUCCAGCUUGGC ACUGAUCCUUAUGAAGAUUUUCAAGAAAACUGGAACACUAAACAU AGCAGUGGUGUUACCCGUGAACUCAUGCGUGAGCUUAAACGGAGGG GCAUACACUCGCUAUGUCGAUAACAACUUCUGUGGCCCUGAUGGC UACCCUCUUGAGUGCAUUAAGACCUUCUAGCACGUGCUGGUAAA	SARS-CoV-2 合成標的 (領域 1)

10

20

30

40

50

【表 3 9 - 2】

	GCUUCAUGCACUUUGUCCGAACAACUGGACUUUAUUGACACUAAG AGGGGUGUAUACUGCUGCCGUGAACAUAGAGCAUGAAAUUGCUUG GUACACGGGAACGUUCUGAAAAGAGCUAUGAAUUGCAGACACCUUU UGAAAAUAAAUUGGCAAAGAAAUUUGACACCUUCAUUGGGGAAU GUCCAAAUUUUGUAUUUCCCUUAAAUCCAUAUUAAGACUAUUC AACCAAGGGUUGAAAAGAAAAAGCUUGAUGGCUUUUUGGGUAGA AUUCGAUCUGUCUAUCCAGUUGCGUCACCAAUGAAUGCAACCAA AUGUGCCUUUCAACUCUCAUGAAGUGUGAUCAUUGUGGUGAAACU UCAUGGCAGACGGGCGAUUUUGUUAAGCCACUUGCGAAUUUUGU GGCACUGAGAAUUUGACUAAAAGAAGGUGCCACUACUUGUGGUAC UUACCCCAAAAUGCUGUUGUUA AAAUUUUAUUGUCCAGCAUGUCAC AAUUCAGAAAGUAGGACCUGAGCAUAGUCUUGCCGAAUACCAUAAU GAAUCUGGCUUGAAAACCAUUCUUCGUAAGGGUGGUCGCACUAUU GCCUUUGGAGGCGUGUGUUCUCUUAUGUUGGUUGCCAUAACAAG UGUGCCUAUUGGGUUCACGUGCUAGCGCUAACAUAGGUUGUAAC CAUACAGGUGUUGUUGGAGAAGGUUCCGAAGGUCUUAUUGACAA CCUUCUUGAAAUACUCCAAAAAGAGAAAGUCAACAUAUUAUUGU UGCGGGCC	
3	GGGCGAAUUGGGUACCGGGCCCCCUCGAGGUCGACGGUAUCGA UAAGCUUGAUUUCGAAUUCUGCAGCCCGGGGAUCCAGUAAAA CAACUGUAGCGUCACUUAUCAACACACUUAACGAUCUAAAUGAAA CUCUUGUUAACAUGCCACUUGGCUAUGUAACACAUGGCUUAAAUU UGGAAGAAGCUGCUCGGUAUUGAGAUUCUCUAAAGUGCCAGCUA CAGUUUCUGUUUCUACCCUGAUGCGUUAACAGCGUAUAAUGGUU AUCUUACUUCUUCUUA AAAACACCUGAAGAACA UUUUAUUGAAA CCAUCUCACUUGCUGGUUCCUUA AAAAGAUUGGUCCUAUUCUGGAC AAUCUACACAACUAGGUUAAGAAUUCUUAAGAGAGGUGAUAAA AGUGUAUUAUACACUAGUAAUCCUACCACAUUCCACCUAGAUGGU GAAGUUAUACCCUUGACAAUCUUAAGACACUUCUUCUUGGAGA GAAGUGAGGACUAUUAAGGUGUUACAACAGUAGACAACA UUA CCUCCACACGCAAGUUGUGGACAUGUCAAUGACAUAUGGACAACA GUUUGGUCCAACUUAUUGGAUGGAGCUGAUGUUACUAAAAUAA AACCUCAUAAUUCACAUGAAGGUAAAACAUUUUAUGUUUUAACCUA AUGAUGACACUCUACGUGUUGAGGCUUUUGAGUACUACCACACAA CUGAUCCUAGUUUUCUGGGUAGGUACAUGUCAGCAUUA AAUACACA CUAAAAAGUGGAAAUACCCACAAGUUAUUGGUUUAACUUCUAUU AAAUGGGCAGAUAAACAACUGUU AUCUUGCCACUGCAUUGUUAACA CUCCAACAAUAGAGUUGAAGUUUAUCCACCUGCUCUACAAGAU GCUUAUUACAGAGCAAGGGCUGGUGAAGCUGCUAACUUUUGUGCA CUUAUCUUAAGCCUACUGUAAUAAGACAGUAGGUGAGUUAGGUGA UGUUAAGAGAAACAAGAGUUAUUGUUUAACAUGCCAAUUAAG AUUCUUGCAAAAAGAGUCUUGAACGUGGUGUGUAAAACUUGUGGA CAACAGCAGACAACCCUUAAGGGUGUAGAAGCUGUUAUGUACAUG GGCACACUUUCUUAUGAACAAUUAAGAAAGGUGUUCAGCGGCC	SARS-CoV-2 合成標的 (領域 2)
4	AGGTGCGTACTAACATCAAG	IC 増幅用 オリゴマー
5	CACGTTGTCTGGAAGTTTG	IC 増幅用 オリゴマー
6	TAGATGGCCGTCTGTCGTATCCA	IC 検出用プローブ
7	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGATGATTGACTTGTGATTCC GC	IC 増幅用 オリゴマー
8	GATTATATAGGACGACAAG	IC 増幅用 オリゴマー
9	GGUGCGAAUUGGGACAUG	IC 検出用プローブ
10	CGUUCACUAUUGGUCUCUGCAUUCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAA	IC 標的捕捉用 オリゴヌクレオチド
11	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGA	プロモーター配列
12	CTTGATGGCTTTATGGGTAGA	増幅用オリゴマー

10

20

30

40

50

【表 39 - 3】

13	GAGTTGAAAGGCACATTTGGTTG	増幅用オリゴマー
14	ATCTGTCTATCCAGTTGCGTCACCAA	検出用プローブ
15	GAAGCTGCTCGGTATATGAGA	増幅用オリゴマー
16	GAAGTAAGATAACCATTATACGCT	増幅用オリゴマー
17	TGCCAGCTACAGTTTCTGTTTCTTCAC	検出用プローブ
18	CTTGATGGCTTTATGGGTAGAATTCGA	増幅用オリゴマー
19	GCTTGATGGCTTTATGGGTAG	増幅用オリゴマー
20	GCTTTATGGGTAGAATTC	増幅用オリゴマー
21	GCTTGATGGCTTTATGGGTAGAATT	増幅用オリゴマー
22	GGAAGAAGCTGCTCGGTATATGA	増幅用オリゴマー
23	CTGCTCGGTATATGAGATCTCTC	増幅用オリゴマー
24	CTCGGTATATGAGATCTCTC	増幅用オリゴマー
25	GTATATGAGATCTCTCAAAGTG	増幅用オリゴマー
26	gcttgatggctttatgggtagaattcga	増幅用オリゴマー 領域
27	cttgatggctttatgggtag	増幅用オリゴマー 領域
28	gctttatgggtag	増幅用オリゴマー 領域
29	ggaagaagctgctcggtatatgagatctctcaagtgc	増幅用オリゴマー 領域
30	ctgctcggtatatga	増幅用オリゴマー 領域
31	ctcggtatatgaga	増幅用オリゴマー 領域
32	AUCUGUCUAUCCAGUUGCGUCACCAA	検出用プローブ
33	AUCUGUCUAUCCAGUUGCGUCACC	検出用プローブ
34	AUCUGUCUAUCCAGUUGCGUCAC	検出用プローブ
35	UCUGUCUAUCCAGUUGCGUCACCA	検出用プローブ
36	UCUGUCUAUCCAGUUGCGUCACC	検出用プローブ
37	UCUGUCUAUCCAGUUGCGUCAC	検出用プローブ
38	CUAUCAGUUGCGUCACCAA	検出用プローブ
39	CUAUCAGUUGCGUCACCA	検出用プローブ
40	GUCUAUCCAGUUGCGUCACCAA	検出用プローブ
41	UCGAUCUGUCUAUCCAGUUGCGUC	検出用プローブ
42	AUUUGGUGACGCAACUGGAUAGACAGAU CGAAUU	検出用プローブ
43	GCCAGCUACAGUUUCUGUUUCUUCACC	検出用プローブ
44	GUGCCAGCUACAGUUUCUGUUUCUUCACC	検出用プローブ
45	GUGCCAGCUACAGUUUCUGUUUCUUCAC	検出用プローブ
46	CAAAGUGCCAGCUACAGUUUCUGUUUC	検出用プローブ
47	CAAAGUGCCAGCUACAGUUUCUGUUU	検出用プローブ
48	GUGCCAGCUACAGUUUCUGUUUCUUCA	検出用プローブ
49	UCAGGUGAAGAAACAGAAACUGUAGCUGGCACUUUGAGA	検出用プローブ
50	aattcgatctgtctatccagttgcgtcaccaaatgaatgc	検出用プローブ 領域
51	ATCTGTCTATCCAGTTGCGTC	検出用プローブ 領域

10

20

30

40

50

【表 3 9 - 4】

52	gtctatccagttgcgtc	検出用プローブ領域
53	gtctatccagttgcgtcaccaa	検出用プローブ領域
54	tctcaaagtgccagctacagtttctgtttctcacctgatgct	検出用プローブ領域
55	GCCAGCUACAGUUUCUGUUU	検出用プローブ領域
56	gtgccagctacagtttctgtttctca	検出用プローブ領域
57	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGTTGAAAGGCACATTTG GTTG	増幅用オリゴマー
58	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGAGTTGAAAGGCACATTG	増幅用オリゴマー
59	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGAGAGTTGAAAGGCAC	増幅用オリゴマー
60	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACACACTTCATGAGAGTTGAAAGGC	増幅用オリゴマー
61	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACTTCATGAGAGTTGAAAGGC	増幅用オリゴマー
62	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACACACTTCATGAGAGTTGAAAG	増幅用オリゴマー
63	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACCATTATACGCTGTAACAGCATC	増幅用オリゴマー
64	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACCATTATACGCTGTAACAGC	増幅用オリゴマー
65	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGATAACCATTATACGCTG	増幅用オリゴマー
66	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAAGAAGTAAGATAAC	増幅用オリゴマー
67	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGAAGAAGTAAGATAACCA TTATACG	増幅用オリゴマー
68	AATTTAATACGACTCACTATAGGGGAAGAAGAAGTAAGATAACCAT TATACGCT	増幅用オリゴマー
69	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAAGAAGTAAGATAACCAT TATAC	増幅用オリゴマー
70	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTAAGATAACCATTATACGC	増幅用オリゴマー
71	GAGAGTTGAAAGGCACATTTG	増幅用オリゴマー
72	ATGAGAGTTGAAAGGCAC	増幅用オリゴマー
73	CACACTTCATGAGAGTTGAAAGGC	増幅用オリゴマー
74	CTTCATGAGAGTTGAAAGGC	増幅用オリゴマー
75	CACACTTCATGAGAGTTGAAAG	増幅用オリゴマー
76	CCATTATACGCTGTAACAGCATC	増幅用オリゴマー
77	CCATTATACGCTGTAACAGC	増幅用オリゴマー
78	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAAGTAAGATAACCATTAT ACGCT	増幅用オリゴマー
79	GATAACCATTATACGCTG	増幅用オリゴマー
80	GAAGAAGTAAGATAAC	増幅用オリゴマー

10

20

30

40

50

【表 39 - 5】

81	AGAAGAAGTAAGATAACCATTATACG	増幅用オリゴマー
82	GAAGAAGTAAGATAACCATTATACGCT	増幅用オリゴマー
83	GAAGAAGTAAGATAACCATTATAC	増幅用オリゴマー
84	GTAAGATAACCATTATACGC	増幅用オリゴマー
85	CACACTTCATGAGAGTTGAAAGGCACATTTGGTTG	増幅用オリゴマー 領域
86	GAGTTGAAAG	増幅用オリゴマー 領域
87	GAGTTGAAAGGC	増幅用オリゴマー 領域
88	GAGTTGAAAGGCACATTTG	増幅用オリゴマー 領域
89	AGAAGAAGTAAGATAACCATTATACGCTGTAACAGCATC	増幅用オリゴマー 領域
90	GATAACCATTATACG	増幅用オリゴマー 領域
91	GUCUUGAUUAUGGAAUUUAAGGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAA	標的捕捉用オリゴ ヌクレオチド
92	CAAGUAGUGGCACCUUCUUUAGUCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAA	標的捕捉用オリゴ ヌクレオチド
93	CUGAAUUGUGACAUGCUGGACUUUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAA	標的捕捉用オリゴ ヌクレオチド
94	GCCAGAUUCAUUUUGGUUUUCGGCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAA	標的捕捉用オリゴ ヌクレオチド
95	CCUAGUUGUGUAGAUUGUCCAGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAA	標的捕捉用オリゴ ヌクレオチド
96	GGUGGAAUGUGGUAGGAUUACUTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAA	標的捕捉用オリゴ ヌクレオチド
97	GUCUUGAUUAUGGAAUUUAAGG	標的捕捉用オリゴ ヌクレオチドTHS
98	CAAGUAGUGGCACCUUCUUUAGUC	標的捕捉用オリゴ ヌクレオチドTHS
99	CUGAAUUGUGACAUGCUGGAC	標的捕捉用オリゴ ヌクレオチドTHS
100	GCCAGAUUCAUUUUGGUUUUCGGC	標的捕捉用オリゴ ヌクレオチドTHS
101	CCUAGUUGUGUAGAUUGUCCAG	標的捕捉用オリゴ ヌクレオチドTHS
102	GGUGGAAUGUGGUAGGAUUACU	標的捕捉用オリゴ ヌクレオチドTHS
103	GGUCUAUCCAGUUGCGUCACCAGACC	検出用プローブ
104	CUGUCUAUCCAGUUGCGUCACCAAUUGGACAG	検出用プローブ
105	CCAGCUACAGUUUCUGUUUCUUCACGCUUG	検出用プローブ
106	GCUACAGUUUCUGUUUCUUCACCUUGUAGC	検出用プローブ
107	GGUCUAUCCAGUUGCGUCACC	検出用プローブ
108	CUGUCUAUCCAGUUGCGUCACCAAUUG	検出用プローブ
109	CCAGCUACAGUUUCUGUUUCUUCAC	検出用プローブ

10

20

30

40

50

【表 3 9 - 6】

110	GCUACAGUUUCUGUUUCUUCACCUG	検出用プローブ
111	GTATATGAGATCTCTC	増幅用オリゴマー領域
112	CCATTATACGCTGTA	増幅用オリゴマー領域
113	GTAAGATAAC	増幅用オリゴマー領域
114	CTATCCAGTTGCGTCA	検出用プローブ領域
115	GCTACAGTTTCTGTTT	検出用プローブ領域

10

【 0 3 5 0】

例証を目的として特定の実施形態を本明細書に記載したが、本開示の趣旨および範囲を逸脱することなく様々な変更を加えることができることは、上述のことから、理解されるであろう。本明細書に引用する全ての公表文献、特許および特許出願は、これによりそれらの全体があらゆる目的で参照により本明細書に組み込まれる。

【図面】

【図 1】

【図 2】

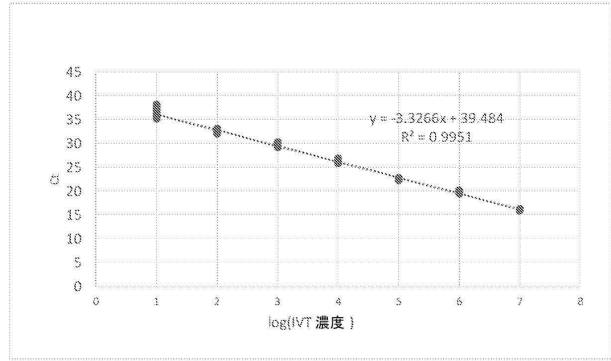


FIG. 1

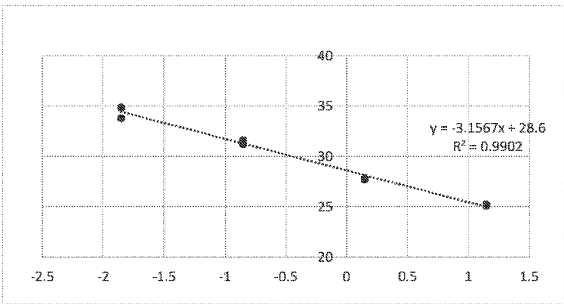


FIG. 2

20

30

【配列表】

2023516683000001.app

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2021/020839
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:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/020839

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/70 ADD.		
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) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Who Team: "Molecular assays to diagnose COVID-19: Summary table of available protocols", 24 January 2020 (2020-01-24), XP055732018, Retrieved from the Internet: URL: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa_2&download=true [retrieved on 2020-09-18] the whole document ----- -/--	1-44
☒ 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 "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
16 June 2021		28/06/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Ulbrecht, Matthias

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/020839

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VICTOR M CORMAN ET AL: "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR", EUROSURVEILLANCE, vol. 25, no. 3, 23 January 2020 (2020-01-23), XP055695049, FR ISSN: 1560-7917, DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045 the whole document -----	1-44
X	Yinhua Zhang ET AL: "Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP", medRxiv, 29 February 2020 (2020-02-29), XP055730127, DOI: 10.1101/2020.02.26.20028373 Retrieved from the Internet: URL:https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.26.20028373v1 [retrieved on 2020-09-15] the whole document -----	1-44
X	Anonymous: "HB BestPlex(TM) COVID-19 RT-PCR Kit", Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical laboratories, 1 January 2020 (2020-01-01), pages 1-2, XP055752904, Retrieved from the Internet: URL:https://gtac-on.de/pdf/HB%20COVID-19%20RT-PCR%20Kit(Brochure)27082020.pdf [retrieved on 2020-11-23] the whole document -----	1-44
X	WU FAN ET AL: "A new coronavirus associated with human respiratory disease in China", NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD., ETC, vol. 579, no. 7798, 3 February 2020 (2020-02-03), pages 265-269, XP037099569, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/S41586-020-2008-3 [retrieved on 2020-02-03] the whole document -----	1-44

フロントページの続き

(32)優先日 令和2年5月4日(2020.5.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/078,790

(32)優先日 令和2年9月15日(2020.9.15)

(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,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁護士 山本 健策

(72)発明者 シャー, アンクル エイチ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92131, サンディエゴ, ストローニー リッジ アベニュー 10560

(72)発明者 イートン, バーバラ リン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92131, サンディエゴ, ピノ ノワール サークル 10892

(72)発明者 ゲットマン, デイモン キトレッジ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92064, パウウェイ, ガーデン ロード 14542

(72)発明者 モバリー, ジョシュア カラニ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92064, パウウェイ, ビア ステファン 13358

(72)発明者 ダービー, ポール エム.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92126, サンディエゴ, メンカー ロード 8458

(72)発明者 ファム, ジミーキム

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92117, サンディエゴ, ヒダルゴ アベニュー 4510

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ10 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR55 QR62
QS25 QS34 QX01