



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2020100221, 30.08.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
31.08.2017 US 62/552,546

(43) Дата публикации заявки: 30.09.2021 Бюл. № 28

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 31.03.2020(86) Заявка РСТ:
US 2018/048903 (30.08.2018)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2019/046610 (07.03.2019)Адрес для переписки:
190900, г. Санкт-Петербург, BOX 1125, Нилова
Мария Иннокентьевна(71) Заявитель(и):
ИОНИАН ТЕКНОЛОДЖИС, ЛЛС (US)(72) Автор(ы):
ЧЖАН, Хунхуа (US),
ПОТ, Ричард (US)A
2020100221
RU

(54) РЕАКЦИЯ АМПЛИФИКАЦИИ С РАЗРЫВОМ И УДЛИНЕНИЕМ (NEAR) РАЗНОВИДНОСТЕЙ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА

(57) Формула изобретения

1. Композиция, содержащая

i) первую прямую матрицу, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую область распознавания на 3'-конце, комплементарную 3'-концу антисмысловой цепи неструктурного гена NS2 респираторно-синцитиального вируса (RSV); сайт связывания нижнего фермента и сайт разрыва против хода транскрипции от области распознавания; и область стабилизации против хода транскрипции от сайта разрыва; и

ii) первую обратную матрицу, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую область распознавания на 3'-конце, комплементарную 3'-концу смысловой цепи неструктурного гена NS2 RSV; сайт связывания нижнего фермента и сайт разрыва против хода транскрипции от области распознавания; и область стабилизации против хода транскрипции от сайта разрыва; или

iii) вторую прямую матрицу, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую область распознавания на 3'-конце, комплементарную 3'-концу антисмысловой цепи гена N нуклеокапсида RSV; сайт связывания нижнего фермента и сайт разрыва против хода транскрипции от области распознавания; и область стабилизации против хода транскрипции от сайта разрыва; и

iv) вторую обратную матрицу, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую область распознавания на 3'-конце, комплементарную 3'-концу

R U
2 0 2 0 1 0 0 2 2 1
A

смысловой цепи гена N нуклеокапсида RSV; сайт связывания никующего фермента и сайт разрыва против хода транскрипции от области распознавания; и область стабилизации против хода транскрипции от сайта разрыва.

2. Композиция по п. 1, где область распознавания на 3'-конце, комплементарная 3'-концу антисмысловой цепи неструктурного гена NS2 RSV, имеет длину 8-30 нуклеотидов, и/или где область распознавания на 3'-конце, комплементарная 3'-концу антисмысловой цепи гена N нуклеокапсида RSV, имеет длину 8-30 нуклеотидов.

3. Композиция по п. 1 или 2, где область распознавания на 3'-конце, комплементарная 3'-концу смысловой цепи неструктурного гена NS2 RSV, имеет длину 8-30 нуклеотидов, и/или где область распознавания на 3'-конце, комплементарная 3'-концу смысловой цепи гена N нуклеокапсида RSV, имеет длину 8-30 нуклеотидов.

4. Композиция по любому из пп. 1-3, где композиция, содержащая i) и ii), дополнительно содержит олигонуклеотидный зонд, содержащий нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности неструктурного гена NS2 RSV.

5. Композиция по любому из пп. 1-3, где композиция, содержащая iii) и iv), дополнительно содержит олигонуклеотидный зонд, содержащий нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности гена N нуклеокапсида RSV.

6. Композиция по любому из пп. 1-4, где последовательность нукleinовой кислоты первой прямой матрицы содержит нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 (CGACTCACACGAGTCGAAAACTTGATGAAAGA); и последовательность нукleinовой кислоты первой обратной матрицы содержит нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 (AGACTCCACACGGAGTCTAGTTGACCAGGAATG).

7. Композиция по любому из пп. 2-4 и 6, где композиция, содержащая i) и ii), дополнительно содержит олигонуклеотидный зонд, содержащий нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 (ACCAGGAATGTAAATGTGGCCTGGT).

8. Композиция по любому из пп. 1-3 и 5, где последовательность нукleinовой кислоты второй прямой матрицы содержит нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6 (GACTCGCACACCGAGTCACGTAGTACAGGAGATAA); последовательность нукleinовой кислоты второй обратной матрицы содержит нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 7 (GACTCCACACGGAGTCGCTTTGCACATCATAA).

9. Композиция по любому из пп. 1-3, 5 и 8, где композиция, содержащая iii) и iv), дополнительно содержит олигонуклеотидный зонд, содержащий нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 8 (TGACACATCATAATTGGGAGTGTCA).

10. Композиция по любому из пп. 1-9, дополнительно содержащая одну или более ДНК-полимераз, один или более никующих ферментов, дНТФ или смесь дНТФ и ддНТФ.

11. Композиция по п. 10, где ДНК-полимераза выбрана из группы, состоящей из

ДНК-полимеразы *Geobacillus bogazici*, Bst (большой фрагмент), экзо-ДНК-полимеразы, ДНК-полимеразы Manta 1.0 (Enzymatics ®).

12. Способ по п. 10, где один или более никующих ферментов выбраны из группы, состоящей из Nt. BspQI, Nb. BbvCI, Nb. BsmI, Nb. BsrDI, Nb. BtsI, Nt. AlwI, Nt. BbvCI, Nt. BstNBI, Nt. CviPII, Nb. Bpu10I, Nt. Bpu10I и N. BspD61.

13. Композиция по любому из пп. 1-12, где композиция является лиофилизированной.

14. Композиция по любому из пп. 4, 5, 7 и 9, где зонд конъюгирован с обнаружимой меткой.

15. Композиция по п. 14, где обнаружимая метка выбрана из группы, состоящей из флуорофора, фермента, гасителя, ингибитора фермента, радиоактивной метки, члена связывающейся пары и их комбинации.

16. Композиция по любому из пп. 1-15, где одна или более из первой прямой матрицы, первой обратной матрицы, второй прямой матрицы или второй обратной матрицы содержат один или более модифицированных нуклеотидов, спейсеров или блокирующих групп.

17. Композиция по п. 16, где по меньшей мере один модифицированный нуклеотид включает модификацию в 2'-положении.

18. Композиция по п. 17, где по меньшей мере один модифицированный нуклеотид включает 2'-О-метил.

19. Способ обнаружения наличия или отсутствия RSV в биологическом образце, включающий:

приведение указанного биологического образца в контакт с композицией, содержащей i) первую прямую матрицу, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую область распознавания на 3'-конце, комплементарную 3'-концу антисмысловой цепи неструктурного гена NS2 RSV; сайт связывания никующего фермента и сайт разрыва против хода транскрипции от области распознавания; и область стабилизации против хода транскрипции от сайта разрыва;

ii) первую обратную матрицу, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую область распознавания на 3'-конце, комплементарную 3'-концу смысловой цепи неструктурного гена NS2 RSV; сайт связывания никующего фермента и сайт разрыва против хода транскрипции от области распознавания; и область стабилизации против хода транскрипции от сайта разрыва;

iii) по меньшей мере один никующий фермент; и

(iv) ДНК-полимеразу;

амплификацию нуклеотидной последовательности-мишени в реакции амплификации нукleinовой кислоты с получением продукта амплификации; и

обнаружение наличия или отсутствия указанного продукта амплификации.

20. Способ по п. 19, где по меньшей мере один никующий фермент включает первый никующий фермент, способный вносить разрыв в сайт разрыва первой прямой матрицы и не вносящий разрыв в антисмысловую цепь неструктурного гена NS2 RSV, и/или второй никующий фермент, способный вносить разрыв в сайт разрыва первой обратной матрицы и не вносящий разрыв в смысловую цепь неструктурного гена NS2 RSV, где первый никующий фермент и второй никующий фермент могут быть одинаковыми или разными.

21. Способ по любому из пп. 19, 20, где композиция дополнительно содержит олигонуклеотидный зонд, содержащий нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности неструктурного гена NS2 RSV.

22. Способ обнаружения наличия или отсутствия RSV в биологическом образце, включающий:

приведение указанного биологического образца в контакт с композицией, содержащей

i) вторую прямую матрицу, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую область распознавания на 3'-конце, комплементарную 3'-концу антисмысловой цепи гена N нуклеокапсида RSV; сайт связывания нижнего фермента и сайт разрыва против хода транскрипции от области распознавания; и область стабилизации против хода транскрипции от сайта разрыва,

ii) вторую обратную матрицу, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую область распознавания на 3'-конце, комплементарную 3'-концу смысловой цепи гена N нуклеокапсида RSV; сайт связывания нижнего фермента и сайт разрыва против хода транскрипции от области распознавания; и область стабилизации против хода транскрипции от сайта разрыва,

iii) по меньшей мере один нижний фермент; и

(iv) ДНК-полимеразу;

амплификацию нуклеотидной последовательности-мишени в реакции амплификации нуклеиновой кислоты с получением продукта амплификации; и

обнаружение наличия или отсутствия указанного продукта амплификации.

23. Способ по п. 22, где по меньшей мере один нижний фермент включает первый нижний фермент, способный вносить разрыв в сайт разрыва второй прямой матрицы и не вносящий разрыв в антисмысловую цепь гена N нуклеокапсида RSV, и/или второй нижний фермент, способный вносить разрыв в сайт разрыва второй обратной матрицы и не вносящий разрыв в смысловую цепь гена N нуклеокапсида, где первый нижний фермент и второй нижний фермент могут быть одинаковыми или разными.

24. Способ по любому из пп. 22, 23, где композиция дополнительно содержит олигонуклеотидный зонд, содержащий нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности гена N нуклеокапсида RSV.

25. Способ по любому из пп. 19-24, где амплификацию проводят в по существу изотермических условиях.

26. Способ по любому из пп. 19-21 и 25, где последовательность нуклеиновой кислоты первой прямой матрицы содержит нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1; и последовательность нуклеиновой кислоты первой обратной матрицы содержит нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2.

27. Способ по любому из пп. 19-21 и 26, где олигонуклеотидный зонд содержит нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3.

28. Способ по любому из пп. 22-24, где последовательность нуклеиновой кислоты второй прямой матрицы содержит нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6; и последовательность нуклеиновой кислоты второй обратной матрицы содержит нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 7.

29. Способ по любому из пп. 22-24 и 28, где олигонуклеотидный зонд содержит нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 8.

30. Способ по любому из пп. 19-29, где композиция дополнительно содержит дНТФ или смесь дНТФ и ддНТФ.

31. Способ по любому из пп. 19-30, где ДНК-полимераза выбрана из группы, состоящей из ДНК-полимеразы *Geobacillus bogazici*, *Bst* (большой фрагмент), экзо-ДНК-полимеразы, ДНК-полимеразы *Manta* 1.0 (Enzymatics ®).

32. Способ по любому из пп. 19-31, где первая прямая и первая обратные матрицы, вторая прямая и вторая обратные матрицы содержат сайты связывания никующего фермента, распознаваемые одним и тем же по меньшей мере одним никующим ферментом.

33. Способ по любому из пп. 19-32, где по меньшей мере один никующий фермент выбран из группы, состоящей из *Nt. BspQI*, *Nb. BbvCI*, *Nb. BsmI*, *Nb. BsrDI*, *Nb. BtsI*, *Nt. AlwI*, *Nt. BbvCI*, *Nt. BstNBI*, *Nt. CviPII*, *Nb. Bpu10I*, *Nt. Bpu10I* и *N. SBspD61*.

34. Способ по любому из пп. 21, 24, 27 и 29, где зонд конъюгирован с обнаружимой меткой.

35. Способ по п. 34, где обнаружимая метка выбрана из группы, состоящей из флуорофора, фермента, гасителя, ингибитора фермента, радиоактивной метки, члена связывающейся пары и их комбинации.

36. Способ по любому из пп. 19-35, где по меньшей мере один никующий фермент вносит разрыв по ходу транскрипции от сайта связывания никующего фермента.

37. Способ по любому из пп. 19-36, необязательно включающий извлечение/выделение нуклеиновой кислоты из биологического образца перед амплификацией.

38. Способ по любому из пп. 19-37, где биологический образец выбран из фекалий, мазков из полости рта/зева, слюны, гноя, мокроты, крови и мочи, или где биологический образец взят из инфицированных или неинфицированных тканей.

39. Способ по любому из пп. 19-38, где одна или более из первой прямой матрицы, первой обратной матрицы, второй прямой матрицы или второй обратной матрицы содержат один или более модифицированных нуклеотидов, спайсеров или блокирующих групп.

40. Способ по п. 39, где по меньшей мере один модифицированный нуклеотид включает модификацию в 2'-положении.

41. Способ по п. 40, где по меньшей мере один модифицированный нуклеотид включает 2'-О-метил.

42. Набор, содержащий:

олигонуклеотидную матрицу, выбранную из группы, состоящей из:

(а) первой прямой матрицы, содержащей нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1; и

первой обратной матрицы, содержащей нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2; или

(б) второй прямой матрицы, содержащей нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6; и

и второй обратной матрицы, содержащей нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 7.

43. Набор по п. 42, где (а) дополнительно содержит олигонуклеотидный зонд, содержащий нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3.

44. Набор по п. 42, где (б) дополнительно содержит олигонуклеотидный зонд, содержащий нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80%,

по меньшей мере 85% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 8.

45. Набор по п. 42, дополнительно содержащий тампон.
46. Набор по п. 42, дополнительно содержащий инструкции по применению набора.
47. Набор по п. 42, дополнительно содержащий один или более дНТФ или смесь дНТФ и ддНТФ.
48. Набор по п. 42, необязательно содержащий реагент для извлечения/выделения нуклеиновой кислоты из биологического образца.
49. Набор по любому из пп. 42-48, где олигонуклеотидная матрица содержит один или более модифицированных нуклеотидов, спайсеров или блокирующих групп.
50. Набор по п. 49, где по меньшей мере один модифицированный нуклеотид включает модификацию в 2'-положении.
51. Набор по п. 50, где по меньшей мере один модифицированный нуклеотид включает 2'-О-метил.
52. Набор по п. 42, дополнительно содержащий полимеразу.