

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-516796
(P2025-516796A)

(43)公表日 令和7年5月30日(2025.5.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/34 (2006.01)	C 1 2 N	15/34	Z N A	4 B 0 6 3
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z	4 C 0 8 5
C 1 2 Q	1/6813(2018.01)	C 1 2 Q	1/6813	Z	4 H 0 4 5
C 0 7 K	16/08 (2006.01)	C 0 7 K	16/08		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全40頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-568408(P2024-568408)	(71)出願人	501173391		
(86)(22)出願日	令和5年5月17日(2023.5.17)		アンスティテュ・パストゥール		
(85)翻訳文提出日	令和7年1月14日(2025.1.14)		INSTITUT PASTEUR		
(86)国際出願番号	PCT/IB2023/000264		フランス国パリ、リュ、デュ、ドクトー		
(87)国際公開番号	WO2023/223092		ル、ルー、2 5 - 2 8		
(87)国際公開日	令和5年11月23日(2023.11.23)	(71)出願人	520404621		
(31)優先権主張番号	63/343,205		エコール ナショナル ヴェテリネール		
(32)優先日	令和4年5月18日(2022.5.18)		ダルフォール		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		フランス国, 9 4 7 0 0 メゾン・アル		
(31)優先権主張番号	63/373,343		フォール, 7 アベニュー ドゥ ジェネ		
(32)優先日	令和4年8月24日(2022.8.24)	(71)出願人	500257447		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		アシスタンス ピュブリック・オピト ド		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		パリ		
			ASSISTANCE PUBLIQUE		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ヒトサーコウウイルスの同定

(57)【要約】

本発明は、ヒト肝炎患者由来の試料における最初の病原性ヒトサーコウウイルスの発見に関し、そのカプシドは、アミノ酸レベルにおいて、最も近縁の既知のサーコウウイルスに対してわずか39%の同一性を示す。この発見は、ヒトサーコウウイルスに特異的な、組換え核酸、プライマー、ペプチド、プローブ、抗体、免疫原性組成物の生成および診断アッセイの生成を可能にする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトサーコウイルス 1 (H C i r V - 1) ヌクレオチド配列を含む組換え核酸であって、前記配列が好ましくは配列番号 10 またはそのバリエーションである、組換え核酸。

【請求項 2】

前記ヌクレオチド配列が H C i r V - 1 カプシドまたはレプリカーゼ配列である、請求項 1 に記載の組換え核酸。

【請求項 3】

前記ヌクレオチド配列が、配列番号 1 のカプシドヌクレオチド配列もしくは配列番号 11 のレプリカーゼヌクレオチド配列、またはそれらのバリエーションもしくはそれらの少なくとも 10 個の連続したヌクレオチドの断片を含む、請求項 1 または 2 に記載の組換え核酸。

10

【請求項 4】

前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2、配列番号 12、配列番号 16 または配列番号 17 に対して少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、93%、95%、97%、98%、99%、または 100% の同一性を有するタンパク質をコードする、請求項 1 または 2 または 3 に記載の組換え核酸。

【請求項 5】

単離された H C i r V - 1 核酸の診断試薬としての *in vitro* 使用であって、前記核酸が、好ましくは、配列番号 10、配列番号 1、もしくは配列番号 11 のヌクレオチド配列、またはそれらの少なくとも 10 個の連続したヌクレオチドの断片を含む、*in vitro* 使用。

20

【請求項 6】

配列番号 1 の、または配列番号 10 もしくは配列番号 11 の配列のいずれかの少なくとも 10 個の連続したヌクレオチドを含む、プライマーまたはプローブ。

【請求項 7】

配列番号 4 ~ 9 または配列番号 13 ~ 15 から選択される配列を有し、好ましくは、蛍光標識、放射性標識、または酵素標識で標識されている、請求項 6 に記載のプライマーまたはプローブ。

【請求項 8】

請求項 6 または 7 に記載のプライマーまたはプローブと、増幅および／またはハイブリダイゼーション試薬とを含む、キット。

30

【請求項 9】

診断アッセイにおける、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組換え核酸または請求項 6 もしくは 7 に記載のプライマーもしくはプローブまたは請求項 8 に記載のキットの *in vitro* 使用。

【請求項 10】

H C i r V - 1 ウイルスを検出する *in vitro* 法であって、前記方法が、請求項 6 または 7 に記載のプライマーまたはプローブを生体試料と接触させること、および試料における H C i r V - 1 核酸の存在または非存在を検出することを含む、*in vitro* 法。

40

【請求項 11】

単離された H C i r V - 1 タンパク質またはペプチドの診断試薬としての *in vitro* 使用であって、前記タンパク質またはペプチドが、好ましくは、配列番号 2、配列番号 12、配列番号 16、もしくは配列番号 17、またはそれらの断片もしくはバリエーションを有する、*in vitro* 使用。

【請求項 12】

ワクチンとしての使用のための、単離された H C i r V - 1 タンパク質またはペプチドであって、前記タンパク質またはペプチドが、好ましくは、配列番号 2、配列番号 12、配列番号 16、もしくは配列番号 17、またはそれらの断片もしくはバリエーションを有する

50

、単離されたH C i r V - 1タンパク質またはペプチド。

【請求項 13】

配列番号2もしくは配列番号12もしくは配列番号16もしくは配列番号17またはそれらのバリエーションの少なくとも15、16、17、18、19、20、30、40、または50アミノ酸を含む、単離されたタンパク質またはペプチド。

【請求項 14】

配列番号2もしくは配列番号12もしくは配列番号16もしくは配列番号17またはそれらのバリエーションの少なくとも15、16、17、18、19、20、30、40、または50アミノ酸を含む単離されたタンパク質またはペプチドの、診断剤としての i n v i t r o 使用。

【請求項 15】

ワクチンとしての使用のための、配列番号2もしくは配列番号12もしくは配列番号16もしくは配列番号17またはそれらのバリエーションの少なくとも15、16、17、18、19、20、30、40、または50アミノ酸を含む、単離されたタンパク質またはペプチド。

【請求項 16】

H C i r V - 1タンパク質またはペプチドに特異的に結合する単離された抗体であって、前記タンパク質またはペプチドが、好ましくは、配列番号2、配列番号12、配列番号16、もしくは配列番号17、またはそれらの断片もしくはバリエーションを有する、単離された抗体。

【請求項 17】

前記タンパク質が、配列番号2、配列番号12、配列番号16、もしくは配列番号17、またはそれらの断片もしくはバリエーションのアミノ酸配列を有する、請求項16に記載の単離された抗体。

【請求項 18】

H C i r V - 1ウイルスタンパク質の、診断アッセイにおける抗原としての i n v i t r o 使用であって、前記タンパク質が、好ましくは、配列番号2、配列番号12、配列番号16、もしくは配列番号17、またはそれらの断片もしくはバリエーションを有する、 i n v i t r o 使用。

【請求項 19】

ワクチンにおける抗原としての使用のための、H C i r V - 1ウイルスタンパク質であって、前記タンパク質が、好ましくは、配列番号2、配列番号12、配列番号16、もしくは配列番号17、またはそれらの断片もしくはバリエーションを有する、H C i r V - 1ウイルスタンパク質。

【請求項 20】

H C i r V - 1を検出する i n v i t r o 法であって、請求項13に記載のタンパク質もしくはペプチドまたは請求項16もしくは17に記載の単離された抗体を生体試料と接触させること、および試料におけるH C i r V - 1タンパク質または抗体の存在または非存在を検出することを含む、 i n v i t r o 法。

【請求項 21】

請求項13に記載のタンパク質またはペプチドを含む、免疫原性組成物またはワクチン組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトサーコウイルス感染症の検出または診断であって、前記ウイルスまたはそれに対する抗体の少なくとも1種の核酸またはタンパク質の、生体試料における存在を決定することを含む、検出または診断に関する。本発明はまた、ウイルス核酸またはタンパク質に由来する様々な診断剤、特に核酸プライマーおよびプローブ、抗原および抗体、ならびにサーコウイルスによるウイルス感染症および関連疾患、特に肝炎の診断のための

10

20

30

40

50

それらの使用に関する。本発明はさらに、サーコウイルス感染症および関連疾患、特に肝炎の予防のためのワクチンとしての、ウイルスタンパク質に由来する抗原に関する。

【背景技術】

【0002】

サーコウイルスは、約2 kbの環状一本鎖DNAゲノムを有するCircoviridae科における小さなウイルスである。Huiら、Viruses 2021、13、944。サーコウイルスは、鳥類、哺乳類、爬虫類、および魚類における、無症候性から致死までの様々な疾患と関連する。Id。病原性ヒトサーコウイルスはこれまでに記載されていなかった。

【発明の概要】

【0003】

ヒト肝炎は、高い死亡率を伴う、世界中で数百万人の人々に影響を及ぼす健康上の問題である、潜在的に致死的な疾患である。A型肝炎ウイルス（HAV）は急性の自然治癒する肝炎を引き起こすが、全ての肝臓指向性ウイルス（B、C、D、およびE型肝炎ウイルス（HBV、HCV、HDV、およびHEV））は、慢性感染症を生じる可能性がある。CDCによれば、既知のウイルスによって引き起こされたと診断されない急性肝炎は、「一部の医薬品、薬物、アルコール、および毒素への曝露によって引き起こされる可能性がある。それはまた、自己免疫疾患によって引き起こされる可能性もある。非ウイルス性肝炎の他の考えられる原因としては、汚染された水または食品、栄養補助食品およびハーブサプリメント、伝統療法または家庭療法、自生するキノコおよび植物、ならびに金属、溶媒、塗料希釈剤、または農薬などの化学物質が挙げられる。Acute Non-Viral Hepatitis of Unknown Etiology Potentially Associated with an Alkaline Water Product、CDC、2021の調査。加えて、依然として未知のウイルスが関与する可能性もある。したがって、診断の妥当性は、疾患の適切な管理のために必須である。この文脈において、可能な診断検査の範囲を改善し、診断の効率を高めることができる、肝炎の原因となる新たな病原体の同定に対する必要性が当技術分野に存在する。本発明は当技術分野におけるこの必要性を満たすものである。

【0004】

本発明は、図面を参照することによってより完全に理解される。

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1】図1は、HCirV-1のカプシド遺伝子の、最も近縁のサーコウイルス属メンバーとの系統解析を示す図である。

【図2】図2は、配列に関する品質スコア（Qスコア）を示す図である。

【図3】図3は、Microseekおよび同定された最も近縁のウイルス配列を使用した患者の肝生検の配列決定後のCircoviridae配列の同定を示す図である。

【図4】図4は、臨床および実験室データを示す図である。上段のパネルは、ウイルス量（HCirV-1、CMV、EBV、TTV）、肝臓細胞融解マーカー（ALAT、ASAT、GGT）、および血液細胞数（リンパ球、白血球、および血小板）の経時的なモニタリングを表す。下段のパネルは、患者の処置歴を要約する。

【図5】図5は、小葉性肝炎、アポトーシス小体、肝細胞腫脹および風船様腫大が、リンパ球および組織球で構成されたわずかな炎症性浸潤物によって囲まれて存在していたことを示す図である（G 20倍、HES）。

【図6】図6は、HCirV-1の系統解析を示す図である。HCirV-1およびサーコウイルス株の代表例のカプシドタンパク質配列の系統解析。配列を、MAFFTを用いてLINS-Eパラメータでアラインメントし、最尤法による系統樹再構築を、NGPhylogenyポータルを介して実装されたPhyMLを用いて実施した。HCirV-1カプシド遺伝子は赤色で示される。

【図7】図7は、肝切片におけるin situハイブリダイゼーションを示す図である

10

20

30

40

50

。肝細胞の核および細胞質におけるHCirV-1 mRNA（赤色で表示される）の発色 *in situ* ハイブリダイゼーション検出。核を、ハリスヘマトキシリンを用いて対比染色した（G 40倍）。

【発明を実施するための形態】

【0006】

新規ヒトサーコウイルスは、ヒト肝炎患者由来の試料において同定された。新規ヒトサーコウイルスのカプシドは、アミノ酸レベルにおいて、最も近縁のサーコウイルスである *Wolv* *fec* サーコウイルス、Genbank Q5X73454 に対してわずか39%の同一性を示す。カプシド遺伝子の系統解析は、このウイルスがサーコウイルス属メンバー内の新たなクレードに相当することを示す。

10

【0007】

ウイルス学および臨床データの収束は、本発明者らが、今日まで動物の病原体によってのみ表されていたウイルス群に属する新たな肝臓指向性ウイルスを仏国において同定したことを示す。HCirV-1は、ヒト、またはさらには他の脊椎動物における、より重症度の低い、未分類形態の肝炎または他の疾患の原因となり得る。

【0008】

HCirV-1 DNAおよびタンパク質配列の固有の性質は、他のサーコウイルス属メンバーを増幅させることも検出することもしない、ヒトサーコウイルスに特異的な、組換え核酸、発現ベクター、プライマー、ペプチド、プローブ、抗体、免疫原性組成物の生成ならびにキットおよび診断アッセイの作成を可能にする。

20

【0009】

組換え核酸

本発明は、HCirV-1 核酸配列を含む組換え核酸を包含する。一実施形態において、組換え核酸は、HCirV-1 カプシドまたはレプリカーゼ配列を含む。

【0010】

一実施形態において、本発明の組換え核酸は、HCirV-1 のカプシドタンパク質およびレプリカーゼタンパク質をコードする、HCirV-1 の全ゲノムに相当する以下の核酸配列を含むかまたはそれからなる：

【0011】

CAGTATTACCCGGCACCTCGGAACCTGGAACCAAGGAGCAAGATAGAGGTTTTTCAGG
TGTGGCACTTGGCAGCCTATCAAGATGGATGGACCCGCCAAAAAGAGCAAGGTGCT
GTATGGTGTTCCTGTGGCAGTGCCGGGTCTGAATGTGAAATATGTTTTTGCTGATA
ATGTATTGTACTGGCATTGTGATGACTGTTATAAGTTTTGGCTGGATGAGAAGGAG
ATCAATCTTATGTGTATTTGGATGCAGCGGGAGAGCCCAGTGGCGAGGTGGTGT
TTACGATAAACAACCTGGACCCAAGAAGAGTTGGATTGCTTGCTGCAGTGTGGCAA
GAGAAAGCGAAGTATCTTTGTATCGGCAGAGAGGTTGGAAGCGGCGGTACCCGGCA
CTTGCAAGGATACGTGAATTTCAAGAACAAGCGAAGAATGAGACAGGTAAAGGCCT
TGCCTGGTTTTATGCGTGCTCACTTAGAAGCGGCCAAGGGGACCGAGAAGCAGGCG
AGCGACTACTGCAAGAAAGACGGCGATTACCTGGAGATTGGAGAGAGTGGCTGTGC
GGGGCGCCGACTGGATTTGGAGACAGCAGCGAAGATACTGACTGAGTCTGGCGGGA
ACTTGAAGTGTGTTGCCGAGGCTTGTCCCGGGGTTTATATAAAGTATGGGCGGGGT
TTGAGGGATTACGCAAGTGTTATGAAATTAAAGCAACCTCGCAATTTTAAAGAGTAC
TGTGATTGTTATATGTGGGGATCCTGGTTGTGGGAAACTAGATATGTTATGGAGG
ATTGTAGGGAGAAAGGGTTAAGCATGTATTGGAAGCCAAGGGGAATTTGGTGGGAT
GGCTATGATGGGGAGGATGTGGTGGTGTATGATGATTTTTATGGGTGGGTTCCTTA
TGATGAGATGTTGAGGGTTATGGATAGGTATCCTTTGAAGGTTCTGTTAAGGGGG
GTTATGTGGATTTTACATCTAAGATTATATATGTGACAAGTAATGTGAAGCCTGAG
GATTGGTATAGTAGTGAGAATATTAAGGGGAAGTTGGAGAGTTTGTTTAGGCGGAT
CAATGTTTATCTGGAGGGTTTTTGGCGGGGAGATCCGTGTGGGAACGCCTCTGTATC
CTATTAACCTATTAATAAAGACAAACAATGGTTGAAGTTCAACGGTTTGTTTATTTG

30

40

50

GCGGGTACAATTGGCGGGAAGGAGGGGAAAAATGGCGGGAGTTACTGACTGGGCGGC
ACAGCCGCGCGGGGGTCCCCGACAGGGTCGGGGCGCGGGGGATCTTTTCCGGCCG
CCCCGTTAGGGCAGGAAAAGCGTTTACCTGGTCACTTGGGGCGGGTCACCCCCCTC
GGAGTCAGTTTATATAAGTTTGTCTAGAGAAGGTATTTCCATTTGATCCAGGCTGA
TTTGATGAGCCAGTATCTGACTGGTTGATTATATTCAACGTAATGAGAGTACTTGA
GTCCTCCCCATTTGACAGTAGATTCTGCAGAGTTCCACCAGGTTCTGCGTGGGAGG
AGAGCTGATGCTTGAGAAGAAGTAGTATTGCCAGTAAGATGGATGAGAGGGCGAGG
AGTAAAATATCTGCTATGCTTTCTGTTAGCCTTCCAAAGTCTGGAAGTGGCAGTGT
TGCAGAGTAGGTTTGATTGTACTGTGTAGGTTTCATTCCAGGGTCCATCCAGGTCT
ATGATGGTGTTCCTATAGGCCAGTAGTTTCATTCTGCTGTGTGGCATTGAAGGGAAG
GAAGGTTAGTTTGAGTTTTAGGATTTTATAAAAGTCCCAGCCTGGTGAGGAAACCC
ATTCAGTGAAGGTGGTTGTGTAAGAGCCTTGCATCCATTTTTTTGGCATTGGTTGAA
TCTTGGTTTTTGGAGGGTGAAGGGTTCAGTCTTGCAAAATTTTTGGACAACCTGTTCC
ATTATTGGTGGGACGTCTTATGTAAATGCGGCGTCTCCTGATTCGTGAAATCTGC
GGGCACGCCTCCTGGGGCGGGGTCTTCTCCTCCTGAGGGTATATCTAGCCATGGTG
CCGGT (配列番号 10)

10

【0012】

この配列は、現在、受託番号ON677309として登録されている。

【0013】

一実施形態において、本発明は、配列番号10に対して65%、70%、80%、90%、93%、95%、97%、98%、99%超、または100%の同一性を有するそのバリエーションを包含する。

20

【0014】

特定のバリエーションは、例えば、配列が受託番号ON226770およびOP744467として近年登録されたhCircV-2ウイルスである(Liら、Emerging Infectious Diseases、第29巻、2023年5月5日発行)。これらのバリエーションはそれぞれ、配列番号10と68%および79%の同一性を共有する。

【0015】

本発明の組換え核酸は、配列番号10のヌクレオチド配列と同一の、全てのまたは少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、もしくは2000個の連続したヌクレオチドを含むことができる。

30

【0016】

特定の実施形態において、本発明の組換え核酸は、hCircV-1のカプシドタンパク質をコードするhCircV-1の配列に相当する以下の核酸配列を含むかまたはそれからなる：

【0017】

ATGGCTAGATATACCCTCAGGAGGAGAAGACCCCGCCCCAGGAGGCGTGCCCGCAG
ATTTGACGAATCAGGAGACGCCGCATTTACATAAGACGTCCCACCAATAATGGAA
CAGTTGTCCAAAAATTTTGCAAGACTGAACCTTCACCCTCCAAAACCAAGATTCA
ACCAATGCCAAAAAATGGATGCAAGGCTCTTACACAACCACCCTCAGTGAATGGGT
TTCCTCACCAGGCTGGGACTTTTATAAAATCCTAAAACTCAAACCTAACCTTCCTTCC
CTTCAATGCCACACAGCGAATGAACTACTGGCCTATAGGAAACACCATCATAGACC
TGGATGGACCCTGGAATGAACCTAACACAGTACAATCAAACCTACTCTGCAACACT
GCCACTTCCAGACTTTGGAAGGCTAACAGAAAGCATAGCAGATATTTTACTCCTCG
CCCTCTCATCCATCTTACTGGCAATACTACTTCTTCTCAAGCATCAGCTCTCCTCCC
ACGCAGAACCTGGTGGAACTCTGCAGAAATCTACTGTCAAATGGGGAGGACTCAAGT
ACTCTCATTACGTTGAATATAATCAACCAGTCAGATACTGGCTCATCAAATCAGCC

40

50

TGGATCAAATGGAAATACCTTCTCTAA (配列番号 1)

【0018】

一実施形態において、本発明は、配列番号 1 に対して 65%、70%、80%、90%、93%、95%、97%、98%、99%超、または 100%の同一性を有するそのバリエーションを含む。

【0019】

一部の実施形態において、本発明の組換え核酸は、配列番号 1 の少なくとも 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、200、250、300、350、400、450、500、550、または 600 個の連続したヌクレオチドを含む、配列番号 1 の断片を含む。

10

【0020】

別の実施形態において、組換え核酸は、H C i r V - 1 のレプリカーゼタンパク質をコードする以下の核酸配列を含むかまたはそれからなる：

【0021】

ATGCAGCGGGAGAGCCAGTGCGGAGGTGGTGTTTTACGATAAACAACTGGACCCA
AGAAGAGTTGGATTGCTTGCTGCAGTGTGGCAAAGAGAAAGCGAAGTATCTTTGTA
TCGGCAGAGAGGTTGGAAGCGGCGGTACCCGGCACTTGCAAGGATACGTGAATTTTC
AAGAACAAGCGAAGAATGAGACAGGTAAAGGCCCTTGCTTGGTTTTATGCGTGCTCA
CTTAGAAGCGGCCAAGGGGACCGAGAAGCAGGCGAGCGACTACTGCAAGAAAGACG
GCGATTACCTGGAGATTGGAGAGAGTGGCTGTGCGGGGCGCCGACTGGATTTGGAG
ACAGCAGCGAAGATACTGACTGAGTCTGGCGGGAACTTGAAGTGTGTTGCCGAGGC
TTGTCCCGGGGTTTTATATAAAGTATGGGCGGGGTTTGAGGGATTACGCAAGTGTTA
TGAAATTAAAGCAACCTCGCAATTTTAAGAGTACTGTGATTGTTATATGTGGGGAT
CCTGGTTGTGGGAAAAGTAGATATGTTATGGAGGATTGTAGGGAGAAAGGGTTAAG
CATGTATTGGAAGCCAAGGGGAATTTGGTGGGATGGCTATGATGGGGAGGATGTGG
TGGTGTATGATGATTTTTATGGGTGGGTTCCTTATGATGAGATGTTGAGGGTTATG
GATAGGTATCCTTTGAAGGTTCTGTAAAGGGGGGTTATGTGGATTTTACATCTAA
GATTATATATGTGACAAGTAATGTGAAGCCTGAGGATTGGTATAGTAGTGAGAATA
TTAAGGGGAAGTTGGAGAGTTTGTTTAGGCGGATCAATGTTTATCTGGAGGGTTTT
GGCGGGGAGATCCGTGTGGGAACGCCTCTGTATCCTATTAAGTATTA (配列番号 1
1)

20

30

【0022】

一実施形態において、本発明は、配列番号 1 1 に対して 65%、70%、75%、80%、85%、90%、93%、95%、97%、98%、99%超、または 100%の同一性を有するそのバリエーションを含む。

【0023】

本発明の組換え核酸は、配列番号 1 1 のヌクレオチド配列と同一の、全てのまたは少なくとも 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、もしくは 850 個の連続したヌクレオチドを含むことができる。

40

【0024】

一実施形態において、本発明の組換え核酸は、細菌または酵母における複製のための複製起点を含む。

【0025】

一実施形態において、本発明の組換え核酸は、発現を可能にする異種配列、例えば異種プロモーターまたはエンハンサーを含む。

【0026】

一実施形態において、本発明の組換え核酸は、H C i r V - 1 のカプシドタンパク質の以下のアミノ酸配列またはその断片をコードする：

50

【0027】

MARYTLRRRRPRPRRRARRFRRIIRRRRIYIRRPNTNNGTVVQKFKTEPFTLQNQDS
TN AKKWMQGSYTTTLSEWVSSPGWDFYKILKLKLTFLPFNATQRMNYWPIGNTII
DL DGP WNEPNTVQSNLLCNTATSRLWKANRKH SRYFTPRPLIHLTGNTTSSQASAL
LPRRTW WNSAESTVKWGGGLKYSHYVEYNQPVRYWLIKSAWIKWKYLL (配列番号
2)

【0028】

一実施形態において、本発明の組換え核酸は、配列番号2に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、93%、95%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するタンパク質をコードする。

10

【0029】

別の実施形態において、本発明の組換え核酸は、HCirV-1のレプリカーゼタンパク質の以下のアミノ酸配列またはその断片をコードする：

【0030】

MQRESPVARWCFTINNWTQEELDCLLQCGKEKAKYLCIGREVGSGGTRHLQGYVNF
KNKRRMRQVKALPGFMRAHLEAAKGTEKQASDYCKKDG DYLEIGESGCAGRRLDLE
TAAKILTESGGNLKCVAEACPGVYIKYGRGLRDYASVMKLKQPRNFKSTVIVICGDP
GCGKTRYVMEDCREKGLSMYWKPRGIWWDGYDGEDVVVYDDFYGWVPYDEMLRV
MDRYPLKVPVKGGYVDFTSKIIYVTSNVKPEDWYSSENIKGKLESLFRRINVYLEGFG
GEIRVGTPLYPINY (配列番号12)

20

【0031】

一実施形態において、本発明の組換え核酸は、配列番号2または配列番号12の配列のいずれかに対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、93%、95%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するタンパク質をコードする。

【0032】

発現ベクター

本発明は、HCirV-1タンパク質の発現のための組換えベクターを包含する。組換えベクターは、真核生物または原核生物発現のためのベクター、例えば、プラスミド、細菌導入のためのファージ、酵母を形質転換させることができるYAC、ウイルスベクター、とりわけレトロウイルスベクター、または任意の発現ベクターであり得る。本明細書において定義される発現ベクターは、*in vitro*または*in vivo*のいずれかにおいてHCirV-1タンパク質またはポリエピトープの産生を可能にするように選択される。

30

【0033】

一実施形態において、本発明の発現ベクターは、配列番号2または配列番号12に対して少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、93%、95%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するタンパク質をコードする。

【0034】

一実施形態において、本発明の発現ベクターは、配列番号2または配列番号12における配列のいずれかに対して50%、60%、70%、80%、90%、93%、95%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するタンパク質をコードする。

40

【0035】

一実施形態において、本発明の発現ベクターは、タンパク質精製タグをコードする。一実施形態において、発現ベクターは、HCirV-1タンパク質コード配列とポリHisタグなどのタンパク質精製タグとの間に挿入されたプロテアーゼ切断部位、例えばTEV切断部位をコードする。好ましい実施形態において、発現ベクターはHisタグをコードする。一実施形態において、プロテアーゼ切断部位は、例えば精製後にHisタグを除去するように配置される。

【0036】

本発明の発現ベクターは、転写制御領域（プロモーター、エンハンサー、リボソーム結

50

合部位（RBS）、ポリAシグナルを含む）、終結シグナル、原核生物もしくは真核生物複製起点、および／または選択遺伝子を含むことができる。プロモーターの特徴、すなわち、構成的、一過性もしくは誘導性（例えばIPTG）、強いもしくは弱い、組織特異的および／または発生段階特異的プロモーターは、当業者によって、必要とされる発現を考慮して容易に決定することができる。ベクターはまた、条件発現を可能にする配列、例えば、Cre／Lox系または類似の系の配列を含むこともできる。

【0037】

様々な実施形態において、本発明の発現ベクターは、プラスミド、細菌導入のためのファージ、酵母を形質転換させることができるYAC、ウイルスベクター、または任意の発現ベクターである。本明細書において定義される発現ベクターは、*in vitro*または

10

【0038】

本発明による核酸分子またはベクターは、Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL、2000、Wiley and son Inc.、Library of Congress、USA)に記載されているものなどの標準的なプロトコルに従って、それ自体公知である従来の方法によって取得することができる。例えば、それらは、PCRもしくはRT-PCRによる核配列の増幅によって、または代替的に全もしくは部分化学合成によって取得されてもよい。

20

【0039】

本発明のベクターは、それ自体公知である従来 of 組換えDNAおよび遺伝子操作方法によって構築され、宿主細胞に導入される。目的の核酸分子を宿主細胞に導入および維持するために目的の核酸分子が挿入され得る多数のベクターは、それ自体公知であり、適切なベクターの選択は、このベクターに対して想定される使用（例えば、目的の配列の複製、この配列の発現、配列の染色体外形態での維持または代替的に宿主の染色体材料への統合）、および宿主細胞の性質に依存する。

【0040】

本発明は、本発明のベクターを含む細胞をさらに包含する。

【0041】

本発明はまた、本発明の発現ベクターを含む細胞を培養すること、および発現されたタンパク質を回収することを含む、タンパク質を調製する方法を包含する。

30

【0042】

本発明は、これらの方法によって本発明の核酸から産生されるタンパク質をさらに包含する。

【0043】

プライマーおよびプローブ

本発明は、上に記載された本発明のHCirV-1核酸配列に基づくプライマーおよびプローブを包含する。一実施形態において、本発明のプライマーおよびプローブは、HCirV-1カプシドまたはレプリカーゼ配列に基づく。

40

【0044】

一実施形態において、本発明のプライマーおよびプローブは、配列番号1のヌクレオチド配列と同一の少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、100、または150個の連続したヌクレオチドを含むかまたはそれからなる。

【0045】

HCirV-1核酸の増幅に好ましいプライマーは、

HCirV1-Fw1: ACCTGGATGGACCTGGAAT (配列番号4)、

HCirV1-Rv1: AGAGTTCCACCGAGTTCTGC (配列番号5)、

HCirV1-Fw2: TTCGACGAATCAGGAGACGC (配列番号6)、

50

H C i r V 1 - R v 2 : G G C A G T G T T G C A G A G T A G G T (配 列 番 号 7) 、
H C i r V 1 - F w 3 : C A G G A G A C G C C G C A T T T A C A (配 列 番 号 8) 、 お よ び
H C i r V 1 - R v 3 : C C C A T T C A C T G A G G G T G G T T (配 列 番 号 9)
である。

【 0 0 4 6 】

これらの3組のPCRプライマー対(配列番号4~5、配列番号6~7、および配列番号8~9)は、カプシド遺伝子において、短い(500nt未満)断片を増幅させるために設計された(すなわち、6種の個々のプライマーは、3種の順方向プライマーおよび3種の逆方向プライマーに相当した)。サーコウイルスが小さな環状DNAウイルスであることを考慮すると、これらのプライマーはまた、長い(500nt超)断片を増幅させるインバースPCR実験のために、様々な組合せにおいて使用することができる。あるいは、Phi29ポリメラーゼなどの置換増幅酵素(displacement amplification enzyme)もまた、ゲノム増幅、検出およびゲノムフィニッシングのために使用することができる。

10

【 0 0 4 7 】

H C i r V - 1 の 増 幅 ま た は 標 識 に 好 ま し い 他 の T a q M a n プ ラ イ マ ー お よ び プ ロ ー プ は、以下のものである：

H C i r V - F w : 5 ' - T T A G A A G C G G C C A A G G G G A - 3 ' (配 列 番 号 1 3)

H C i r V - R v : 5 ' - C G C T G C T G T C T C C A A A T C C A - 3 ' (配 列 番 号 1 4)

H C i r V - P b : 5 ' - [F A M] G G A G A T T G G A G A G A G T G G C T G [B H Q 1] - 3 ' ([F A M] - 配 列 番 号 1 5 - [B H Q])

20

【 0 0 4 8 】

これらのプライマーおよびプローブの配列は、ヒトサーコウイルスのレプリカーゼタンパク質を、他の非ヒトサーコウイルスを検出せずに特異的に検出するように設計されている。結果として得られるアンプリコンは、約120塩基対のサイズを有する。

【 0 0 4 9 】

好ましくは、本発明のプライマーまたはプローブは、蛍光標識、放射性標識、または酵素標識で標識されている。

【 0 0 5 0 】

本発明のプライマーおよび／またはプローブは、配列番号1、配列番号10または配列番号11のヌクレオチド配列のいずれかと同一の、全てのまたは少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、100、もしくは150個の連続したヌクレオチドを含むことができるかまたはそれからなることができる。

30

【 0 0 5 1 】

本発明のプライマーおよび／またはプローブは、配列番号4~9または配列番号13~15のうちの全てまたは少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21個を含むことができるかまたはそれからなることができる。

【 0 0 5 2 】

本発明は、診断アッセイにおける使用のための本発明のプライマーおよびプローブならびにこれらのアッセイにおけるそれらの使用を包含する。

40

【 0 0 5 3 】

核酸検出および増幅キット

本発明は、上に開示されたものなどの、本発明のプローブおよび／またはプライマーを含有する核酸検出および増幅キットを包含する。

【 0 0 5 4 】

好ましくは、本発明のプライマーまたはプローブは、蛍光、放射性、または酵素標識で標識されている。

【 0 0 5 5 】

50

好ましくは、本発明のキットは、増幅および／またはハイブリダイゼーション試薬を含む。例えば、本発明のキットは、dNTP（dATP、dCTP、dGTP、およびdTTP）、緩衝液、ならびに逆転写酵素および／または熱安定性ポリメラーゼ（例えばTaqポリメラーゼ）を含有することができる。

【0056】

核酸診断アッセイ

本発明は、本発明のプローブおよび／またはプライマーを利用する核酸診断アッセイを包含する。

【0057】

本発明は、HCirV-1の特異的検出のための方法を包含する。

10

【0058】

一実施形態において、本発明の方法は、試料を用意すること、試料を本発明のプローブと接触させること、および試料におけるHCirV-1核酸の存在または非存在を当技術分野における慣例的な技法によって検出することを含む。

【0059】

一実施形態において、試料は、検出のために試料におけるHCirV-1核酸の量を増加させる増幅反応に付すことができる。

【0060】

一実施形態において、本発明の方法は、試料を用意すること、任意選択で、試料を逆転写反応に供して、試料において、HCirV-1 RNAのcDNAコピーを、HCirV-1 RNAに特異的な「逆方向プライマー」を使用して生成すること、HCirV-1 DNAを、「逆方向プライマー」および「順方向プライマー」を用いて増幅させること、ならびに任意の増幅された産物を検出することを含む。一実施形態において、増幅された産物は、プローブを用いて検出される。方法は、HCirV-1が試料に存在するかどうかの決定のために使用することができる。

20

【0061】

HCirV-1核酸の増幅に好ましいプライマーセットは、

HCirV1-Fw1（配列番号4）とHCirV1-Rv1（配列番号5）、

HCirV1-Fw2（配列番号6）とHCirV1-Rv2（配列番号7）、および

HCirV1-Fw3（配列番号8）とHCirV1-Rv3（配列番号9）

である。

30

【0062】

他の好ましいプライマーセットは、

HCirV-Fw: 5'-TTAGAAGCGGCCAAGGGGA-3'（配列番号13）

HCirV-Rv: 5'-CGCTGCTGTCTCCAAATCCA-3'（配列番号14）

である。

【0063】

本発明のアッセイの好ましい実施形態において、試料は、生体試料、例えば、便、唾液、血液、血漿、血清、尿、脳脊髄液、または組織、好ましくは肝臓試料である。一部の実施形態において、試料は、ヒトまたは動物臨床試料（すなわち、サーコウイルスウイルスを有する疑いがある生きているかまたは死んでいる個体（ヒトまたは動物）由来の試料である。別の実施形態において、試料は環境試料（汚水）であり得る。

40

【0064】

試料は、周知の単離および精製プロトコルに供するか、または直接使用することができる。例えば、試料は、従来の技法を使用して、試料の核酸を放出／抽出するための、ならびに／または試料のタンパク質および他の非核酸成分を除去するための処理に供することができる。

【0065】

HCirV-1ゲノムDNAの増幅は、両方ともHCirV-1に特異的である2種のプライマー、すなわち「順方向」および「逆方向」プライマーを用いて実施することがで

50

きる。

【0066】

H C i r V - 1 の R N A の逆転写は、H C i r V - 1 に特異的な「逆方向プライマー」を用いて実施することができる。「逆方向プライマー」とは、その5' - 3' 配向に基づいて、一本鎖RNAに結合し、そのRNAの相補DNA (cDNA) コピーの生成を開始する役割を果たすことができるプライマーである。逆転写は、周知かつ慣例的な方法を使用して達成することができる。逆転写のための反応ミックスは、反応のための試薬、例えば、逆方向プライマー、dNTP (dATP、dCTP、dGTP、およびdTTP)、緩衝液、および逆転写酵素を含有する。例示的な反応条件は、実施例に記載される。

【0067】

逆転写によって生成されたH C i r V - 1 のcDNAコピーの増幅は、H C i r V - 1 に特異的な「順方向プライマー」を用いて実施することができる。「順方向プライマー」とは、その5' - 3' 配向に基づいて、逆転写によって生成されたRNAの一本鎖アンチセンスcDNAコピーに結合し、そのRNAの二本鎖DNAコピーの生成を開始する役割を果たすことができるプライマーである。増幅は、周知かつ慣例的な方法を使用して達成することができる。増幅のための試薬ミックスは、反応のための試薬、例えば、順方向プライマー、逆方向プライマー、dNTP、緩衝液、およびDNAポリメラーゼを含有する。

【0068】

一実施形態において、本発明の方法は、逆転写反応および増幅反応のための試薬を含有する単一のRT-PCR試薬ミックスを使用して実施される。好ましくは、逆転写反応のために使用される逆方向プライマーは、増幅反応のためにも使用される。

【0069】

好ましくは、逆転写および増幅反応は、プラスチックまたはガラスコンテナ、最も好ましくは同じコンテナにおいて実施される。

【0070】

当技術分野において公知の増幅方法としては、RCA、MDA、NASBA、TMA、SDA、LCR、b-DNA、PCR (RT-PCRを含む全ての種類)、RAM、LAMP、ICAN、SPIA、QBLレプリカーゼ、またはInvaderが挙げられる。好ましい増幅方法はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅である。例えば、PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (H. A. Erlich編、Freeman Press、NY、N. Y.、1992) ; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innisら編、Academic Press、San Diego、Calif.、1990) ; Mattilaら、Nucleic Acids Res. 19、4967 (1991) ; Eckertら、PCR Methods and Applications 1、17 (1991) ; PCR (McPhersonら編、IRL Press、Oxford) ; ならびに米国特許第4、683、202号、同第4、683、195号、同第4、800、159号、同第4、965、188号、および同第5、333、675号を参照されたい。より好ましいPCR方法は、リアルタイムPCR、PCR-HRM (高解像度DNA融解) (Andriantsoanirinaら、Journal of Microbiological Methods、78:165 (2009) を参照されたい)、および蛍光マイクロスフェア (Luminex (登録商標) マイクロスフェア) に基づくリガーゼ検出反応と組み合わされたPCRである。

【0071】

増幅技法としては、特に、等温法およびPCRに基づく技法が挙げられる。等温技法としては、核酸配列に基づく増幅 (NASBA)、ループ介在等温増幅 (LAMP)、ヘリカーゼ依存性増幅 (HDA)、ローリングサークル増幅 (RCA)、および鎖置換増幅 (SDA)、指数関数的増幅反応 (EXPAR)、等温キメラプライマー開始核酸増幅 (ICAN)、シグナル媒介RNA増幅技術 (SMART) などのような方法が挙げられる (

10

20

30

40

50

例えば、AsielloおよびBaumner、Lab Chip; 11 (8) : 1420~1430、2011を参照されたい)。

【0072】

好ましくは、PCR技法は、DNA、cDNA、またはRNAの開始量を定量的に測定する。本発明によるPCRに基づく技法の例としては、これらに限定されないが、定量PCR (Q-PCR)、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、定量的逆転写酵素PCR (QRT-PCR)、またはデジタルPCRなどの技法が挙げられる。これらの技法は、当業者に周知であり、容易に利用可能な技術である。好ましくは、Q-PCRは、実施例に記載される、好ましくは本明細書の実施例に記載されるプライマーを用いて実施される。

10

【0073】

好ましくは、本発明の方法は、1工程リアルタイムRT-PCRアッセイである。好ましくは、増幅された産物を検出するためにプローブが使用される。プローブは、蛍光、放射性、または酵素標識で標識することができる。増幅された産物は、特定の検出化学、例えば、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) プローブ、TAQMANプローブ、分子ビーコン、スコピオンプローブ、蛍光標識 (または他の標識) プライマー、ライトアッププローブ、または色素に基づく化学、増幅された産物に結合して目的の配列を検出する修飾塩基を含むDNA、PNA、LNA、もしくはRNAを用いて検出することができる。

【0074】

増幅された産物の検出は、リアルタイム (増幅過程中) であってもエンドポイント (増幅過程後) であってもよい。本発明は、増幅が行われるのと同じ容器における増幅産物の検出を可能にする。

20

【0075】

好ましくは、増幅反応をモニタリングするためにDNA内部対照が使用される。

【0076】

好ましくは、逆転写および増幅反応をモニタリングするためにRNA内部対照が使用される。

【0077】

本発明のプライマーは、HCirV-1 RNAの逆転写とHCirV-1 DNAの増幅との両方に有用である。プライマー配列は、好ましくはHCirV-1に対して選択的である。

30

【0078】

本発明は、プライマーのセット、すなわち、異なる配向の少なくとも2つのプライマーを包含する。好ましくは、プライマーは、1つの順方向プライマーと1つの逆方向プライマーとのセットである。本明細書において言及される全てのプライマーは、このプライマーのセットに明確に含めることができる。

【0079】

「逆方向プライマー」はアンチセンスプライマーであり、これは、逆転写のためのプライマーであることができ、好ましくは、非ヒトサーコウイルスに結合せず、HCirV-1に特異的である。

40

【0080】

一実施形態において、HCirV-1のRNA配列は、好ましくは細胞において、例えばISHによって検出することができる。一実施形態において、bDNAプローブのカクテルは、例えば実施例に記載されるように、HCirV-1のカプシドおよび／またはRep遺伝子を標的とするように設計することができる。一実施形態において、ViewRNA ISH Tissue Assay Kit 2-plex (Thermo Fisher Scientific) が使用可能である。

【0081】

好ましいDNAプローブは、例えば、

HCirV-Pb: 5' - [FAM] GGAGATTGGAGAGAGTGGCTG [

50

BHQ1]-3' ([FAM]-配列番号15-[BHQ])
である。

【0082】

タンパク質およびペプチド

本発明は、HCirV-1アミノ酸配列に基づくタンパク質およびペプチドを包含する。一実施形態において、本発明のタンパク質またはペプチドは、HCirV-1カプシドまたはレプリカーゼタンパク質またはペプチドである。一実施形態において、本発明のタンパク質またはペプチドは、配列番号2（カプシドタンパク質）または配列番号12（レプリカーゼタンパク質）の少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、または250アミノ酸を含むかまたはそれからなる。

10

【0083】

一部の実施形態において、本発明のタンパク質またはペプチドは、配列番号2または配列番号12の配列のいずれかの、全てのまたは少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、もしくは250アミノ酸を含むかまたはそれからなる。これらのペプチドは、本明細書において、本発明の「断片」と称される。

20

【0084】

一部の実施形態において、本発明のタンパク質またはペプチドは、配列番号2または配列番号12に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、93%、95%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するそれらのバリエーションである。

【0085】

好ましい実施形態において、以下のカプシドタンパク質断片は、ウイルスの存在を血清学的手段によって検出するために使用することができる：

【0086】

NNGTVVQKFKCTEPFTLQNQDSTNAKKWMQGSYTTTLSEWVSSPGWDFYKILKLKL
TFLPFNATQRMNYWPIGNTIIDLDPWNEPNTVQSNLLCNTATSRLWKANRKHRSRY
FTPRPLIHLLTGNTTSSQASALLPRRTWWNSAESTVKWGGLKYSHYVEYNQPVRYWL
IKSAWIKWKYLL（配列番号16）

30

【0087】

NNASIVQKFKCKWEPIFQNTTNQNKWYIGSYTTNLKEWVTQPNWDLYKILKMKISF
LPFTPTQKMPYWPIGNTIIDLDPWPQPYTANSNLCNTATSRSWYGNNKKHRSRYFT
PRAVVNLTATTGEGTALLPRSTWWNCNNDIIWGGLRFAHYIENGSNMAIRYHL
QKSVWIKWKYLL（配列番号17）

【0088】

この後者の配列は、2023年5月5日に発行されたLiら、Emerging Infectious Diseases、第29巻のチームによって第2の患者YN09/J030から取得されたヒトサーコウイルスのカプシドタンパク質の断片に相当する。

40

【0089】

一部の実施形態において、本発明のタンパク質またはペプチドは、配列番号16または配列番号17の配列のいずれかの、全てのまたは少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、もしくは175アミノ酸を含むかまたはそれからなる。これらのペプチドもまた、本明細書において、本発明の「断片」と称される。

【0090】

好ましくは、本発明のタンパク質またはペプチドは標識される。一実施形態において、本発明のタンパク質またはペプチドまたは断片は、可視化分子、例えば、放射性原子、色

50

素、蛍光分子、フルオロフォア、酵素、コロイド金、磁性粒子、またはラテックスビーズで標識される。

【0091】

本発明は、診断アッセイにおける使用のための本発明のタンパク質およびペプチドならびにこれらのアッセイにおけるそれらの使用を包含する。

【0092】

抗体

本発明は、上に記載されたHCirV-1タンパク質配列に対して生成された抗体を包含する。一実施形態において、抗体は、配列番号2または配列番号12または配列番号16／17のタンパク質に結合する。好ましくは、抗体は、Wolfeckサーコウイルス（Genbank Q5X73454、配列番号3）などの他のいかなるサーコウイルスのカプシドタンパク質にも、プタサーコウイルス3のカプシドタンパク質にも結合しない。

10

【0093】

本発明は、診断アッセイにおける使用のための本発明の抗体およびこれらのアッセイにおけるそれらの使用を包含する。

【0094】

一実施形態において、本発明のポリクローナルまたはモノクローナル抗体は、ウサギまたはマウスにおいて生成される。

【0095】

一実施形態において、本発明のVHH抗体は、例えばアルパカにおいて生成される。

20

【0096】

本発明は、上に記載されたHCirV-1タンパク質またはペプチドまたは断片（上に記載された配列番号2、12、16、17、またはそれらの任意のバリエーションもしくは断片）を対象とするポリクローナルもしくはモノクローナル抗体またはそれらの断片を包含する。

【0097】

一実施形態において、本発明の抗体は、HCirV-1タンパク質を用いた動物の免疫化によって取得することができる。

【0098】

本発明の抗体は、イムノアッセイにおいて、患者の天然HCirV-1タンパク質と結合する試薬として機能することができる。

30

【0099】

本発明の抗体は、患者のイムノアッセイにおいて、単離および精製されたHCirV-1タンパク質と結合する陽性対照試薬として機能することができる。

【0100】

本発明の本発明は、HCirV-1タンパク質を対象とするポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、およびそれらの断片（例えば、Fab、Fv、scFv）を包含する。

【0101】

本発明の目的において、発現キメラ抗体とは、特定の動物種の抗体または抗体の特定のクラスの抗体との関連において、別の動物種の抗体または抗体の別のクラスの抗体の重鎖および／または軽鎖の全部または一部を含む抗体を意味するものと理解される。

40

【0102】

一部の実施形態において、精製されたタンパク質は、従来の技法によって抗体を産生するために使用される。一部の実施形態において、組換えまたは合成タンパク質またはペプチドは、従来の技法によって抗体を作製するために使用される。

【0103】

抗体は、合成、半合成、モノクローナル、またはポリクローナルであることができ、当技術分野において周知の技法によって作出することができる。そのような抗体は、抗体の

50

抗原結合性部位を介してタンパク質およびポリペプチドに（非特異的結合ではなく）特異的に結合する。精製または合成タンパク質およびペプチドは、それらと免疫反応性の抗体を産生する場合、免疫原として用いることができる。タンパク質およびペプチドは、抗体の形成を誘発する抗原決定基またはエピトープを含有する。

【0104】

これらの抗原決定基またはエピトープは、線状または構造的（不連続）のいずれであってもよい。線状エピトープは、ポリペプチドのアミノ酸の単一の部分から構成され、構造的または不連続エピトープは、タンパク質が折り畳まれることによって非常に近接するポリペプチド鎖の異なる領域由来のアミノ酸部分から構成される（C. A. Janeway, Jr. および P. Travers, *Immuno Biology* 3:9 (Garland Publishing Inc., 第2版, 1996)）。折り畳まれたタンパク質は複雑な表面を有するため、利用可能なエピトープの数は非常に多いが、タンパク質の立体構造および立体障害のために、エピトープに実際に結合する抗体の数は、利用可能なエピトープの数よりも少ない（C. A. Janeway, Jr. および P. Travers, *Immuno Biology* 2:14 (Garland Publishing Inc., 第2版, 1996)）。エピトープは、当該分野において公知の方法のいずれかによって同定することができる。そのようなエピトープまたはそれらのバリエーションは、当技術分野において周知の技法、例えば、固相合成、ポリペプチドの化学的もしくは酵素的切断、または組換えDNA技術を使用して産生させることができる。

【0105】

抗体は、約 10^7 M^{-1} 以上の K_a でタンパク質またはポリペプチドと結合する場合、特異的に結合すると定義される。結合パートナーまたは抗体の親和性は、従来の技法、例えば Scatchardら、*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 51:660 (1949) によって記載されているものを使用して容易に決定することができる。

【0106】

ポリクローナル抗体は、様々な供給源、例えば、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ニワトリ、アルパカ、ラクダ、ウサギ、マウス、またはラットから、当技術分野において周知の手順を使用して容易に生成することができる。概して、適切にコンジュゲートされる精製されたタンパク質またはポリペプチドは、典型的には非経口注射を介して宿主動物に投与される。免疫原性は、アジュバント、例えば、フロイント完全または不完全アジュバントの使用によって高めることができる。ブースター免疫化後、少量の血清の試料が採取され、タンパク質またはポリペプチドに対する反応性について検査される。そのような決定に有用な様々なアッセイの例としては、*Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow および Lane (編), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 に記載されているもの、ならびに向流免疫電気泳動 (CIEP)、放射免疫アッセイ、放射免疫沈降、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、ドットブロットアッセイ、およびサンドイッチアッセイなどの手順が挙げられる。米国特許第 4, 376, 110 号および同第 4, 486, 530 号を参照されたい。

【0107】

モノクローナル抗体は、周知の手順を使用して容易に調製することができる。例えば、米国特許再発行出願第 32, 011 号、同第 4, 902, 614 号、同第 4, 543, 439 号、および同第 4, 411, 993 号；*Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKearn および Bechtol (編), 1980 に記載されている手順を参照されたい。

【0108】

例えば、マウスなどの宿主動物は、単離および精製されたタンパク質またはコンジュゲートしたポリペプチド、例えば、上に記載された特定のアミノ酸を含むかまたはそれからなるペプチドを、少なくとも 1 回、好ましくは約 3 週間の間隔で少なくとも 2 回、腹腔内

注射され得る。次いで、どの動物が融合に最良であるかを決定するために、マウス血清が従来のドットブロット技法または抗体捕捉（ABC）によってアッセイされる。およそ2～およそ3週間後、マウスはタンパク質またはポリペプチドの静脈内ブーストを投与される。確立されたプロトコルに従って、その後、マウスは殺され、脾臓細胞が、市販の骨髓腫細胞、例えば、Ag 8.653（ATCC）と融合される。簡潔に述べると、骨髓腫細胞は、培地において数回洗浄され、1個の骨髓腫細胞に対して約3個の脾臓細胞の比でマウス脾臓細胞と融合される。融合剤は、当技術分野において使用される任意の好適な薬剤、例えばポリエチレングリコール（PEG）であり得る。融合体は、融合細胞の選択的増殖を可能にする培地を含有するプレートにプレティングされる。次いで、融合細胞は、およそ8日間増殖させることができる。結果として生じたハイブリドーマの上清は、回収され、ヤギ抗マウスIgを用いて最初にコーティングされたプレートに添加される。洗浄後、標識タンパク質またはポリペプチドなどの標識が各ウェルに添加され、続いてインキュベーションが行われる。その後、陽性ウェルが検出可能となる。陽性クローンは大量培養において増殖させることができ、その後、上清はプロテインAカラム（Pharmacia）によって精製される。

10

20

30

40

50

【0109】

本発明のモノクローナル抗体は、代替的な技法、例えば、参照によって本明細書に組み込まれるAltting-Meesら、「Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas」、Strategies in Molecular Biology 3:1～9（1990）によって記載されているものを使用して産生することができる。同様に、結合パートナーは、特異的結合抗体をコードする遺伝子の可変領域を組み込む組換えDNA技法を使用して構築することができる。そのような技法は、Larrickら、Biotechnology、7:394（1989）に記載されている。

【0110】

従来の技法によって作製することができるそのような抗体の抗原結合性断片もまた本発明によって包含される。そのような断片の例としては、これらに限定されないが、FabおよびF(ab')₂断片が挙げられる。遺伝子操作技法によって産生される抗体断片および誘導体もまた提供される。

【0111】

本発明のモノクローナル抗体には、キメラ抗体、例えばマウスモノクローナル抗体のヒト化形態が含まれる。そのようなヒト化抗体は、公知の技法によって調製することができる。ヒトに投与される場合の免疫原性が低下するという利点をもたらす。一実施形態において、ヒト化モノクローナル抗体は、マウス抗体の可変領域（またはその抗原結合性部位のみ）と、ヒト抗体に由来する定常領域とを含む。あるいは、ヒト化抗体断片は、マウスモノクローナル抗体の抗原結合性部位と、ヒト抗体に由来する可変領域断片（抗原結合性部位を欠いている）とを含むことができる。キメラおよびさらに操作されたモノクローナル抗体の産生のための手順としては、Riechmannら（Nature 332:323、1988）、Liuら（PNAS 84:3439、1987）、Larrickら（Bio/Technology 7:934、1989）、ならびにWinterおよびHarris（TIPS 14:139、1993年5月）に記載されているものが挙げられる。抗体を遺伝子導入により生成する手順は、GB 2,272,440、米国特許第5,569,825号および同第5,545,806号に見出すことができる。

【0112】

遺伝子操作方法によって産生された抗体、例えば、標準的な組換えDNA技法を使用して作出することができる、ヒト部分と非ヒト部分との両方を含むキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は使用することができる。そのようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、当技術分野において公知の標準的なDNA技法を使用した、例えば、Robinsonらの国際公開第WO 87/02671号；Akiraらの欧州特許出願第0184

187号; Taniguchi, M. の欧州特許出願第0171496号; Morrisonらの欧州特許出願第0173494号; NeubergerらのPCT国際公開第WO86/01533号; Cabillyらの米国特許第4,816,567号; Cabillyらの欧州特許出願第0125023号; Betterら、Science 240:1041 1043、1988; Liuら、PNAS 84:3439 3443、1987; Liuら、J. Immunol. 139:3521 3526、1987; Sunら、PNAS 84:214 218、1987; Nishimuraら、Canc. Res. 47:999 1005、1987; Woodら、Nature 314:446 449、1985; およびShawら、J. Natl. Cancer Inst. 80:1553 1559、1988); Morrison, S. L.、Science 229:1202 1207、1985; Oiら、BioTechniques 4:214、1986; Winterの米国特許第5,225,539号; Jonesら、Nature 321:552 525、1986; Verhoeyanら、Science 239:1534、1988; およびBeidlerら、J. Immunol. 141:4053 4060、1988に記載されている方法を使用した遺伝子操作によって産生することができる。

10

20

30

40

50

【0113】

合成および半合成抗体との関連において、そのような用語は、これらに限定されないが、抗体断片、アイソタイプスイッチ抗体、ヒト化抗体（例えば、マウスーヒト、ヒトーマウス）、ハイブリッド、複数の特異性を有する抗体、および完全合成抗体様分子を網羅することが意図されている。

【0114】

一実施形態において、本発明は、NANOBODIESとしても知られている単ドメイン抗体(s d A b)を包含する。s d A bとは、特定の抗原に選択的に結合することができる単一の単量体可変抗体ドメインからなる断片である。

【0115】

一実施形態において、本発明のs d A bは、ラクダ科動物(V H H断片)もしくは軟骨魚類(V N A R断片)に見出される重鎖抗体由来であるか、または二量体可変ドメインを単量体に分割することによって取得される。

【0116】

血清学的小およびウイルス学的診断

上に記載された、H C i r V-1タンパク質およびこれらのタンパク質に由来するペプチドならびにそれらに対して生成された抗体は、ヒトサーコウイルス感染症の検出および診断（特にイムノアッセイ、例えば免疫酵素方法（例えば、E L I S A）による血清学的診断（特異的抗体の検出）またはウイルス学的診断（ウイルスタンパク質の検出）のために使用することができる。

【0117】

本発明は、サーコウイルスに感染した患者を同定するための方法であって、上記患者由来の血清試料を用意すること、血清をH C i r V-1タンパク質と接触させること、および抗原-抗体複合体を可視化することを含む、方法を包含する。好ましくは、抗原-抗体複合体は、E I A、E L I S A、R I A、または免疫蛍光によって可視化される。

【0118】

本発明は、H C i r V-1タンパク質を含む組成物、または生体試料におけるサーコウイルスに対する抗体の検出およびサーコウイルス感染症の診断のためのH C i r V-1タンパク質の使用を包含する。

【0119】

H C i r V-1タンパク質およびそれに由来するペプチドを対象とする本発明による抗体および抗体断片は、サーコウイルス感染症の直接検出および診断、ならびに生体試料におけるH C i r V-1の検出に有用である。H C i r V-1のカプシドまたはレプリカーゼタンパク質の検出は、感染している可能性が高い個体から採取された生体試料において

、適切な技法、特に、E I A、E L I S A、R I A、免疫蛍光によって実行される。

【0120】

一実施形態において、本発明は、生体試料におけるヒトサーコウウイルスの検出のための方法であって、サーコウウイルスに感染した患者由来の生体試料を抗H C i r V - 1抗体と接触させること、および形成された抗原-抗体複合体を可視化することを含むことを特徴とする、方法を含む。好ましくは、抗原-抗体複合体は、E I A、E L I S A、R I A、または免疫蛍光によって可視化される。

【0121】

一実施形態において、本発明のH C i r V - 1タンパク質は、適切な支持体、特にマイクロプレートまたはビーズに結合する。

【0122】

一実施形態において、本発明の方法は、サーコウウイルスに感染した対象、好ましくはヒト由来の生体試料を、適切な支持体、特にマイクロプレートまたはビーズに結合しているH C i r V - 1タンパク質と接触させて、結合を生じさせること、支持体を洗浄して、未結合抗体を除去すること、H C i r V - 1タンパク質に結合している免疫グロブリンに結合する検出試薬を添加すること、および形成されたH C i r V - 1タンパク質-抗体複合体を検出することを含む。

【0123】

一実施形態において、生体試料におけるサーコウウイルスに対する抗体の検出のための本発明の方法は、H C i r V - 1タンパク質を用意すること、サーコウウイルスに感染した患者由来の生体試料を用意すること、前記H C i r V - 1タンパク質を前記生体試料と接触させること、および形成された抗原-抗体複合体を可視化することを含む。好ましくは、方法はE L I S Aを含む。

【0124】

好ましくは、タンパク質-抗体複合体は、ヒト免疫グロブリンに結合する抗体または抗体断片を用いて検出される。

【0125】

好ましくは、検出試薬は、化学発光標識、酵素性標識、蛍光性標識、および放射性（例えば、ヨウ素）標識から選択される標識を含む。最も好ましくは、検出試薬は、ヒト免疫グロブリンに結合する標識抗体または抗体断片である。

【0126】

好ましい標識としては、F I T Cなどの蛍光標識、発色団標識、親和性リガンド標識、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、またはガラクトシダーゼなどの酵素性標識、酵素補因子標識、ジゴキシゲニンまたはジニトロフェニルなどのハプテンコンジュゲート標識、ラマンシグナル生成標識、磁気標識、スピン標識、F L A GまたはH Aエピトープなどのエピトープ標識、発光標識、重原子標識、ナノ粒子標識、電気化学標識、光散乱標識、球殻標識（spherical shell label）、半導体ナノ結晶標識が挙げられ、ここで、標識は、二次検出分子を用いて、または用いることなく、可視化を可能にすることができる。

【0127】

好ましい標識としては、好適な酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペーターガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、もしくはアセチルコリンエステラーゼ；複合体を形成することができる結合対の要素、例えば、ストレプトアビジン／ビオチン、アビジン／ビオチン、もしくは例えばウサギI g Gおよび抗ウサギI g Gを含む抗原／抗体複合体；フルオロフォア、例えば、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオジン、緑色蛍光タンパク質、エリスロシン、クマリン、メチルクマリン、ピレン、マラカイトグリーン、スチルベン、ルシファーイエロー、C a s c a d e B l u e、T e x a s R e d、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、フィコエリスリン、蛍光ランタニド複合体、例えばユウロピウムおよびテルビウムを含む蛍光ランタニ

10

20

30

40

50

ド複合体、シアニン色素ファミリーのメンバー、例えば Cy 3 および Cy 5、分子ビーコンおよびその蛍光誘導体、ならびに当技術分野において公知の他のもの；発光物質、例えばルミノール；光散乱もしくはプラズモン共鳴材料、例えば、金もしくは銀粒子もしくは量子ドット；または ^{14}C 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、もしくは ^3H を含む放射性物質が挙げられる。

【0128】

一実施形態において、ヒト免疫グロブリンに結合する本発明の抗体または抗体断片は、Ig G、Ig A、および Ig M に特異的に結合する。一実施形態において、ヒト免疫グロブリンに結合する本発明の抗体または抗体断片は、Ig G、Ig A、または Ig M に特異的に結合する。

10

【0129】

「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、それらの断片、例えば F (a b ') 2 および Fab 断片、一本鎖可変断片 (s c F v)、単ドメイン抗体断片 (V H H または ナノボディ)、二価抗体断片 (ダイアボディ)、ならびに組換えおよび合成により産生された任意の結合パートナーを含むことが意図されている。

【0130】

好ましい実施形態において、本発明の抗体は、V H H、好ましくはアルパカ血清である。

【0131】

一実施形態において、本発明の方法は、患者血清を用いて取得された結果を陽性および陰性対照と比較することを含む。

20

【0132】

陽性対照としては、

- 上に記載された H C i r V - 1 タンパク質を用いて免疫化された動物（例えば、ウサギ、アルパカなど）由来の血清、
- 好ましくは配列番号 2 を含む、上に記載された H C i r V - 1 タンパク質を挙げることができる。

【0133】

本発明の方法は、他の種のサーコウイルスと交差反応しない、新規サーコウイルスを検出するための H C i r V - 1 タンパク質の使用を含むことができる。

30

【0134】

一実施形態において、本発明の方法は免疫捕捉方法を含む。

【0135】

一実施形態において、本発明の方法は、H C i r V - 1 タンパク質を対象とする第 1 のモノクローナルもしくはポリクローナル抗体またはそれらの断片（捕捉抗体）を結合すること、抗体を、H C i r V - 1 タンパク質を含有する生体試料と共にインキュベートすること、および形成された抗原-抗体複合体を、好ましくはモノクローナル抗体（可視化抗体）を用いて検出することを含む。

【0136】

一実施形態において、本発明の方法において使用される生体試料は、捕捉抗体と接触させる前に、可視化モノクローナル抗体と混合される。

40

【0137】

本発明による免疫捕捉検査において、H C i r V - 1 タンパク質を可視化するために、可視化分子または粒子とコンジュゲートしたモノクローナル抗体を使用することが可能である。

【0138】

可視化分子は、放射性原子、色素、蛍光分子、フルオロフォア、酵素であり得、可視化粒子は、例えば、コロイド金、磁性粒子、またはラテックスビーズであり得る。

【0139】

本発明の主題は、上で定義されたポリクローナルもしくはモノクローナル抗体または抗

50

体断片、およびHCirV-1タンパク質から形成される免疫複合体でもある。

【0140】

抗原および抗体検出キット

本発明は、上に記載されたHCirV-1タンパク質、および／またはそれらに対して生成された抗体を含むことを特徴とするサーコウイルス検出キットを包含する。

【0141】

一実施形態において、本発明のHCirV-1タンパク質は、上に記載された配列番号2もしくは配列番号12もしくは配列番号16／17またはそれらの断片もしくはバリエーションのアミノ酸配列を含む。

【0142】

一実施形態において、本発明は、サーコウイルス感染症の検出のためのキットを含み、このキットは、抗原-抗体複合体の検出のための、上に記載されたHCirV-1タンパク質および試薬を含有する。

【0143】

好ましくは、本発明のキットは、HCirV-1タンパク質を用いて免疫化された動物の血清を含有する。

【0144】

最も好ましくは、本発明の血清は、HCirV-1タンパク質を用いて免疫化された動物由来のウサギまたはアルパカ血清である。

【0145】

一実施形態において、本発明のキットは、上に記載された配列番号2もしくは配列番号12もしくは配列番号16もしくは配列番号17のアミノ酸配列、またはそれらの断片もしくはバリエーションを含むかまたはそれからなるHCirV-1タンパク質を含む。

【0146】

一実施形態において、本発明のキットは、HCirV-1タンパク質とHCirV-1免疫血清との両方を含む。

【0147】

一実施形態において、本発明のキットは、予備スクリーニング検査結果が必要とされる場合に使用するために設計された簡易／迅速な検査である。検査は、凝集、免疫ドット、免疫クロマトグラフィーおよび／または免疫濾過技法に基づく検査であり得る。好ましくは、検査は、短時間かつ容易に、好ましくは約10分～約2時間で実施され、追加の装置をほとんどまたは全く必要としない。

【0148】

好ましくは、本発明のキットは、室温で長期間にわたって保存することができる。

【0149】

免疫原性組成物

本発明はまた、例えば配列番号2、配列番号12、配列番号16もしくは配列番号17、またはそれらの任意のバリエーション／断片の本発明によるペプチドまたはタンパク質を含む免疫原性組成物またはワクチン組成物に関する。

【0150】

特定の実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、アジュバントおよび／または薬学的に許容されるビヒクルをさらに含む。

【0151】

本明細書において定義されるように、薬学的に許容されるビヒクルは、組成物中の本発明によるポリエピトープ、ポリヌクレオチド、ベクターの製剤化を可能にする任意の物質を包含する。ビヒクルは、生理学的に許容される、すなわち、宿主、とりわけヒトと接触する組成物における使用に適切であり、したがって非毒性である、任意の物質または物質の組合せである。そのようなビヒクルの例は、リン酸緩衝生理食塩水溶液、蒸留水、油／水型エマルジョンなどのエマルジョン、様々な種類の湿潤剤 滅菌溶液などである。

【0152】

10

20

30

40

50

本明細書において定義されるように、アジュバントは、例えば、リポソーム、水相を伴うエマルションの形態において一般に使用される油相、例えばフロイント型アジュバントを含むか、または水不溶性無機塩、例えば、水酸化アルミニウム、硫酸亜鉛、水酸化鉄コロイド、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウムを含むことができる。

【0153】

別の特定の実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、非経口経路、例えば、皮下（s.c.）、皮内（i.d.）、筋肉内（i.m.）、腹腔内（i.p.）、または静脈内（i.v.）注射による投与のために製剤化される。

【0154】

別の特定の実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、1回または複数回の投与用量、特にプライムブースト投与計画において投与される。

【0155】

投与される量（投与量）は、処置される対象、例えば、患者の状態、個体の免疫系の状態、投与経路、および宿主の大きさに依存する。好適な投与量は、ウイルスベクターについて 10^3 TCID₅₀ ~ 10^7 TCID₅₀、または100マイクログラムのプラスミドDNAの範囲であり、状況に応じて当業者によって変更することができる。

【0156】

好ましい実施形態において、本発明の免疫原性組成物またはワクチン組成物は、ヒト対象におけるサーコウイルス感染症および関連疾患、特に肝炎の予防における使用のためのものである。

【実施例】

【0157】

本発明者らは、未知の病因の肝細胞融解性肝炎を呈する61歳の固形臓器移植を受けた女性の症例を報告する。本患者は、心室中隔欠損症に関連するアイゼンメンジャー症候群のために、17年前に心肺移植を受けた。維持免疫抑制レジメンには、タクロリムス、ミコフェノール酸モフェチル、およびプレドニゾンが含まれた。彼女は、肝炎発生の16か月前に、急性移植肺機能不全のためにパルスステロイドを受けていた。本患者は、受診の2年半前に外科的処置によって処置された限局性左上葉肺腺癌腫の病歴を有していた。彼女はまた、カルシニューリン阻害薬に起因する慢性腎不全（コッククロフト・ゴールトで $23 \text{ mL} / \text{分}$ ）、*Aspergillus* 種および *Scedosporium* 種による気管支肺感染症、パルボウイルスB19感染症、ならびにCOVID-19感染症の病歴も有していた。

【0158】

2021年11月、本患者は、ホスカビルとその後のマリバビル処置、それに続くレテルモビル長期維持療法を必要とする、耐性ウイルスを伴うCMV大腸炎のために入院した。この時点において、超音波検査によって、症状も肝異常も伴わない細胞融解が検出された（図4）。

【0159】

この入院の4か月後、彼女の肝炎は悪化し、トランスアミナーゼ血清レベルが正常上限の最大40倍まで上昇したため（図4）、再入院に至った。本患者は、直近の体重減少を除いては無症候性であり、プロトロンビン時間レベルが正常であったため生物学的重症度は認められなかった。A、B、C、E型肝炎、HIV、CMV、HSV、VZV、ヒトヘルペスウイルス6、アデノウイルス、エンテロウイルス（血液および便中）、パルボウイルスB19、トキソプラズマ症、梅毒、およびレプトスピラ症を含む通常の感染症は除外した。EBV PCRのみが陽性であった（ 104.4 ゲノムコピー/ mL 血液）。肝酵素の変化と本患者の様々な医薬品との間の時間的な関係に関する証拠は存在しなかった。彼女は、パラセタモール、アルコール、違法薬物、または植物療法のいずれの使用もないことを報告した。心臓超音波は心不全を示さなかった。肝臓超音波およびドップラー検査、CTスキャン、ならびに胆道MRIにおいて、心臓不整脈も、血管または胆道異常も存在しなかった。自己免疫異常に関する検査は陰性であった。最後に、無セルロプラスミン

10

20

30

40

50

血症は正常であった。次いで、肝生検を実施した。病理学的検査は、類上皮肉芽腫も、著しい門脈炎症および線維症も、リンパ増殖も伴わない、わずかに炎症性の小葉性肝炎を示した。Ziehl、EBV、CMVおよびアデノウイルス染色は陰性であった。生検試料の細菌学的検査（マイコバクテリウムの培養およびPCR、広範囲16SリボソームRNA遺伝子PCRを含む）は陰性であった。HSV-1、-2、CMV、アデノウイルスおよびエンテロウイルスPCRは陰性であり、EBV PCRは陽性であった（135 gc/g DNA、サイクル閾値=35）が、急性肝炎が原因であるとは認められなかった。全体的に、炎症のリンパ球パターンは、好酸球浸潤の欠如、血管または胆道損傷の欠如、および自己免疫性肝疾患の欠如（形質細胞なし）と対照的に、ウイルス性肝炎を強力に示唆した。中心小葉壊死とマクロファージによる再吸収との両方の程度は、直近の重要な肝臓細胞融解を暗示した。これらの第1選択の陰性結果の後、mNGSを肝生検に対して行い、これは新規サーコウイルス（HCirV-1）を示した。qPCRによるHCirV-1のさらなる探索および定量を、肝組織、便、気管支肺胞洗浄液、尿、および唾液に対して実施した（表1）。本患者の過去の血液試料の検討および検査もまた行った（表2）。

10

【0160】

【表1】

表1: HCirV-1の検出および定量のためにqPCRによって検査された肝生検、便、尿、唾液、および気管支肺胞(BAL)試料

試料の種類	試料採取日	qPCR Ct値	Cp/mL(尿、唾液、BAL) またはCp/グラム(生検、便)
便	2021年11月19日	23,5	3,12E+05
BAL	2022年01月06日	24,8	3,24E+05
便	2022年01月27日	25,5	7,98E+04
肝生検	2022年03月21日	16,4	3,57E+08
便	2022年04月01日	23,7	2,68E+05
便	2022年05月11日	28,6	1,06E+04
尿	2022年06月08日	26,4	1,13E+05
唾液	2022年06月08日	26,0	1,45E+05
便	2022年06月09日	27,2	2,60E+04

20

30

【0161】

40

50

【表 2】

表2: HCirV-1の検出および定量のためにqPCRによって検査された血液、血漿、および血清試料

試料の種類	試料採取日	qPCR Ct値	Cp/mL
血清	2017年10月11日	陰性	陰性
血清	2019年08月28日	陰性	陰性
血清	2020年06月12日	陰性	陰性
血清	2020年07月24日	陰性	陰性
血清	2020年09月23日	32,4	2,00E+03
血漿	2021年09月17日	17,9	3,24E+07
血清	2021年11月05日	12,4	1,25E+09
血清	2021年11月18日	13,9	4,38E+08
血清	2021年11月30日	15,1	2,07E+08
血清	2021年12月10日	17,4	4,49E+07
血清	2022年01月05日	16,3	9,19E+07
血清	2022年01月12日	8,4	1,72E+10
血清	2022年01月25日	11,5	2,19E+09
血漿	2022年03月10日	15,3	1,77E+08
血清	2022年03月14日	14,6	2,77E+08
血漿	2022年03月16日	15,1	2,08E+08
血清	2022年03月18日	14,3	3,52E+08
血液	2022年04月04日	10,0	5,81E+09
血清	2022年05月05日	18,1	2,73E+07
血清	2022年05月05日	17,2	4,92E+07
血漿	2022年06月08日	19,2	1,36E+07
血液	2022年06月08日	20,3	6,36E+06

【0162】

2022年6月時点において、本患者の臨床状態は現在安定している。本発明者らは、細胞融解の改善を認める。この直近の感染性疾患の文脈において、免疫抑制処置は、ミコフェノール酸モフェチルを中止して、ちょうど最小限に抑えたところである（図4）。本発明者らは、HCirV-1の感染源となり得るものの特定を試みた。本患者は、2匹のネコとの接触を報告し、その両方が鳥類およびげっ歯類と接触していた。診断の2か月後、彼女のネコの糞便のHCirV-1 PCRは陰性であった。本患者は、国外旅行はしていないと報告した。彼女は、最初のHCirV-1検出の17か月前に行われた輸血を報告した（図4）。

【0163】

本発明者らは、重大な肝臓細胞融解を呈する心肺二重移植レシピエントの肝臓においてウイルス配列を探し、新たなサーコウイルスを同定した。

【0164】

損傷した肝組織を生検から取得し、超深度配列決定（ハイスループット配列決定、またはNGS）を実施した。

【0165】

本患者の肝生検由来の核酸を、geneLEAD VII装置（Diagenode）を使用して抽出し、15 ng/Lの濃度を得た。抽出後のRNA完全性数（RNA Integrity Number）（RIN）は2.9であった。メタゲノミクス次世代配列決定ライブ

ラリー調製に関して、2つのプロトコルに従った：(i) SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit-Pico Input Mammalian (タカラバイオ株式会社、キットv. 3) を用いてcDNAライブラリーを構築した。手順は、全RNAの第1鎖cDNAへのランダム逆転写、ヒトリボソームcDNAの枯渇、および最終PCR増幅を含んだ；(ii) SuperScript IV First-Strand Synthesis Systemキット (Invitrogen) を製造業者の説明書に従って、ランダムプライマーと共に使用し、続いてMALBAC増幅 (Yikon Genomics) を行ってcDNAライブラリーを構築し、Illumina DNA Prep (Illumina、以前はNextera DNA Flex) のための入力として使用して、最終NGSライブラリーを作製した。

10

【0166】

RT/MALBAC/DNA Prepライブラリーを、High Outputフローセルを使用するNextSeq500装置 (Illumina) において1×151bpで配列決定し、およそ8000万の生リードを生成した。大部分の生リードは、20超の品質スコア (Qスコア) を有した (図2)。

【0167】

富化ベースの配列決定からの生リードを、品質確認およびトリミング、リード正規化、de novoアセンブリ、ならびにコンティグおよびシングルトンのORF予測と、それに続く3つのレベルの分類学的割当てを含む所内バイオインフォマティクスパイプライン (Microseek; Bigotら、DOI: 10.3390/v14091990) を用いて処理した。それらの関連する分類学的レベルを有する、結果として得られたウイルスヒットをKronaとして示した (図3)。

20

【0168】

入手可能な最長のカプシドコンティグ (k141__422__flag=1__multi=91.0000__len=931__742__41__46__234) は、アミノ酸レベルにおいて、同定された最も近縁のウイルス (Wolvfecサーコウイルス、Genbank QSX73454) に対して39%の同一性を有する。次いで、Circoviridaeとして同定された配列を、GENEIOUS PRIME 2022.1.1 (Biomatters Ltd) を使用して適切な参照配列にマッピングして、全ゲノムを記述した (図3)。種配列として使用した最長のカプシドコンティグから、カプシドの全配列を、反復マッピング手法を使用して再構築した。再構築したカプシドのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を配列番号1および配列番号2に示す。

30

【0169】

新種のサーコウイルスを同定し、Circoviridae科のサーコウイルス属内のヒトサーコウイルス1 (HCirV-1) と命名した。病原性サーコウイルスは、これまでヒトにおいては知られていなかった。

【0170】

配列に基づいて、系統樹を作成し、図1に示す。カプシド遺伝子の系統解析 (blast.ncbi.nlm.nih.gov/) は、このウイルスがサーコウイルス属メンバー内の新たなクレードに相当することを示す。

40

【0171】

新規ヒトサーコウイルスのカプシドは、アミノ酸レベルにおいて、最も近縁のサーコウイルスであるWolvfecサーコウイルス、すなわち、以下に示されるGenbank QSX73454に対してわずか39%の同一性を示す：

【0172】

MRRYRRLRRR RRRRPRRPRY RRRIRRTWIR RPTAGTYTYK KYSTMNIINL GKRE
STKYWKVGHYTTSLKE WGSKWIWDYY KILKMKITFY PQESNCFQHS LLWGHTV
IDY DGSWSTEGWLQDDPYANSST GRVWMSNKKH SRYFTPKPFL VQTSSSYTGQ
SLFYFTRNTP WLNCYDLDTKWGALLFSAYA PADDTTPLYV QKSVWIRFKT VL (配列番号3)

50

【0173】

対照的に、動物においては、肝臓指向性ウイルスの疑いがあるもの（ウマサーコウイルス1株）を含め、多数の公知のサーコウイルスが存在する（嘴羽毛病ウイルス（BFDV）、ブタサーコウイルス1、2、および3（PCV1～3））。Huira、2021（<https://doi.org/10.3390/v13050944>）。HCirV-1のカプシドタンパク質のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を配列番号1および配列番号2に示す。

【0174】

肝生検におけるウイルス配列の数は非常に多く（1000超のコンティグおよびシングルトン）、他のウイルス配列も細菌配列もNGSによって認められず、この疾患におけるHCirV-1の役割を支持した。

【0175】

対照の説明

本発明者らは、肝炎を有するかまたは有しない免疫不全または免疫正常患者の便および血液試料の対照HCirV-1 qPCRを後ろ向きに実施した（表3）。本発明者らはまた、本発明者らの実験室において2019年以来、病原体診断のために肝生検に対して定期的に行っているmNGSの結果も検討した（表4）。

【0176】

【表3】

表3: 特異的HCirV-1 qPCRを実施した36の血液試料および20の便試料におけるHCirV-1の存在の評価のための対照の特徴

対照	肝炎 ^a (n=16)	免疫正常w/o肝炎 (n=12)	免疫不全w/o肝炎 (n=28)	合計 (n=56)
年齢、平均(範囲)、年	17(3-53)	30(0.2-67)	44(1-84)	33(0.2-84)
成人>15歳、n(%)	5(31)	7(58)	22(78)	35(63)
性別、女性、n(%)	4(25)	7(58)	11(39)	22(39)
検査試料、n(%)				
血液	10(62)	8(66)	18(64)	36(64)
便	6(38)	4(33)	10(36)	20(36)
免疫学的状況、n(%)				
免疫正常	5(31)	12(100)	0	17(30)
HIV血清反応陽性	0	0	2(7)	2(4)
固形臓器移植	1(6)	0	12(43)	13(23)
原発性免疫不全	10(63)	0	9(32)	19(34)
HSCTまたは免疫抑制療法	0	0	5(18)	5(9)

表の説明:^a=肝腫大および/または肝臓細胞融解;w/o=有しない;HSCT=造血幹細胞移植

【0177】

10

20

30

40

50

【表 4】

表4: メタゲノミクス次世代配列決定を用いてスクリーニングした57の肝生検試料におけるHCirV-1の存在の評価のための対照の特徴

対照	合計(n=57)
年齢、平均(範囲)、年	13 (0.3-68)
成人>15歳、n(%)	10(18)
性別、女性、n(%)	20(35)
免疫学的状況、n(%)	
免疫正常	5(9)
HIV血清反応陽性	2(4)
固形臓器移植	5(9)
原発性免疫不全	25(44)
HSCTまたは免疫抑制療法	20(35)

10

【0178】

核酸抽出

本患者の肝生検由来の核酸を、geneLEAD VII装置 (Diagenode) を使用して抽出した。200Lの血漿、血清、全血、気管支肺胞洗浄液 (BAL)、および便由来の核酸を、Emag装置 (Biomerieux) を使用して抽出した。

20

【0179】

mNGS

cDNAを、本患者の肝生検から、SuperScript IV First-Strand Synthesis Systemキット (Invitrogen) を使用して生成した。MALBAC増幅 (Yikon Genomics) を、Illumina DNA Prep (Illumina、以前はNextera DNA Flex) のための入力として、これまでに記載されているように使用した [Regnault B、Bigot T、Ma L、Perot P、Temmam S、Eloit M. Deep Impact of Random Amplification and Library Construction Methods on Viral Metagenomics Results. Viruses 2021;13:253]。ライブラリーを、NextSeq500装置 (Illumina) において1×151bpで配列決定し、およそ8000万の生リードを生成した。生リードを、RVDB-prot参照ウイルスデータベースを使用する所内バイオインフォマティクスパイプラインを用いて処理した。Bigot T、Temmam S、Perot P、Eloit M. RVDB-prot, a reference viral protein database and its HMM profiles. F1000Res 2019;8:530。

30

【0180】

qPCR HCirV-1

HCirV-1のカプシド遺伝子に関して以下のPCRプライマーを設計した: HCirV1-Fw1: 5-ACCTGGATGGACCTGGAAT-3 (配列番号4); HCirV1-Rv1: 5-AGAGTTCCACCAGGTTCTGC-3 (配列番号5) (194bp)。定量PCRをSYBR Greenフォーマットにおいて、45サイクルの増幅、58℃のアニーリング温度で行った。45サイクル後の陽性アンプリコンをゲル上で精製し、サンガー配列決定によって確認し、段階希釈に使用して、ウイルス量の算出のための標準曲線を作成した。

40

【0181】

完全なゲノムの獲得

HCirV-1の全ゲノムを、phi29ポリメラーゼ (WTA、Qiagen) を用

50

いた前増幅の後、2022年1月12日の本患者の血漿（1010ウイルスコピー／mLを保有）を配列決定することによって取得した。Geneious Prime 2022.1.1（Biomatters Ltd）を使用した反復マッピング手法を適用して、最終アセンブリを実施した。完全なゲノム配列は、受託番号ON677309としてGenBankに寄託された。

【0182】

肝生検NGSにおける新規サーコウイルスの同定を使用して、肝生検標本からウイルス配列を解析した。カプシドおよびRep遺伝子に相当する、合計で1011のCircoviridae科の配列を同定した。ウイルス血症のピーク時に採取した血漿試料から、本発明者らはウイルスのコンセンサス全ゲノム配列（2021pb）を導出し、これをHCirV-1（Genbank ON677309）と名付け、配列が、肝臓において見出されたカプシド遺伝子の部分的配列と同一であることを確認した。本発明者らは、2種のウイルスタンパク質、すなわちHCirV-1のカプシドおよびRep、ならびに代表的な動物サーコウイルスに対して系統解析を行った。2つの解析結果は一致し、HCirV-1が、最も近縁のウイルス種（Wolvfecサーコウイルスおよびブタサーコウイルス3）と比べて基部に近い位置において新たなクレードを定義することを示した。

10

【0183】

系統学

系統樹再構築を、HCirV-1のカプシドタンパク質配列、レプリカーゼ（Rep）タンパク質配列、および完全なヌクレオチド配列に対して実施した。カプシドおよびレプリカーゼ遺伝子の完全なORFを、MAFFT（高速フーリエ変換を使用する多重アライメント（Multiple Alignment using Fast Fourier Transform））アライメントツールをLINS-iパラメータでを使用して、サーコウイルスの他の代表的な配列と共にアライメントした。最尤法による系統樹再構築を、NGPhylogenyポータルを介して実装されたPhyMLを用いて実施した。Lemoine F、Correia D、Lefort Vら、NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists. Nucleic Acids Research 2019; 47: W260~W265。「近似ベイズ枝支持率（Approximate Bayes branch support）」を使用して節の支持率を評価した。

20

30

【0184】

TTVおよびEBV qPCR

TTV DNA量の測定を、TTV R-GENE（登録商標）キット（Biomerieux、Marcy-l'Etoile、France）を使用して、これまでに記載されているように実施した。Kulifaj D、Durgueil-Lariviere B、Meynier Fら、Development of a standardized real time PCR for Torque teno viruses (TTV) viral load detection and quantification: A new tool for immune monitoring. J Clin Virol 2018; 105: 118~127。EBV DNA量の測定を、EBV R-GENE（登録商標）キット（Biomerieux、Marcy-l'Etoile、France）を使用して実施した。リアルタイムPCR増幅をAB7500プラットフォーム（Applied Biosystems、Waltham、MA、United States）において実施した。

40

【0185】

本発明者らは、定量PCR（qPCR）を設計および実行して、本症例から2017年以来採取している血漿および他の生体試料におけるウイルス量の変化を評価した。本発明者らはまた、ウイルス血症のレベルが移植レシピエントの免疫状況と良好に相関する片利共生ウイルスであるトルクテノウイルス（TTV）の量も評価した。Jaksch P、Goerzer I、Puchhammer-Stoeckl E、Bond G. In

50

egrated Immunologic Monitoring in Solid Organ Transplantation: the Road Towards Torque Teno Virus-guided Immunosuppression. Transplantation 2022. TTV DNA量は、2017年から現在まで0~3.99 log cp/mLで変動した。このことは、低レベルの免疫抑制を示し [Redondo N, Navarro D, Aguado JM, Fernandez-Ruiz M. Viruses, friends, and foes: The case of Torque Teno Virus and the net state of immunosuppression. Transpl Infect Dis 2022; 24: e13778]、TTVウイルス血症ピークは細胞融解におけるピークと関連しなかった。対照的に、血液中にHCV-1が最初に存在したのは2020年9月である可能性があり(103.3 gc/mL)、これはステロイドパルスの2か月後であったが、この直前の試料(2020年7月)は陰性であった。にもかかわらず、チューブは最大109.1 gc/mLを保有する他のチューブと同時に開封しており、交差汚染が生じた可能性があるため、2020年9月のこの低レベルのHCV-1が疑わしかったということは注目に値する。次の利用可能な試料は2021年9月に採取され、強力に陽性であった(107.5 gc/mL)。その後、量は108.3~1010.2 gc/mLで変動した。HCV-1量は、顕著な細胞融解の期間中のみ多かった。【0186】

10

対照におけるHCV-1の存在の評価

20

HCV-1の存在を評価するために同じ特異的qPCRプライマーを使用して検査された対照において、陽性試料は検出されなかった。56名の患者由来の合計で36の血液試料および20の便試料を検査した(表3)。これらの患者のうち、19名(34%)、17名(30%)、13名(23%)、5名(9%)、および2名(4%)はそれぞれ、先天性免疫不全患者、免疫正常患者、固形臓器移植レシピエント患者、造血幹細胞移植レシピエントであるかまたは免疫抑制処置を受けている患者、およびHIV陽性患者であった。肝細胞融解を有する16名の患者のうち(表3)、8名は未知の病因であった。2019年以来mNGSによって定期的にスクリーニングされている対照生検は、肝炎を有し感染源が疑われる57名の患者においてHCV-1配列を示さず、25名(44%)、20名(35%)、5名(9%)、5名(9%)、および2名(4%)はそれぞれ、先天性免疫不全患者、造血幹細胞移植レシピエントであるかまたは免疫抑制処置を受けている患者、免疫正常患者、固形臓器移植レシピエント患者、およびHIV陽性患者であった(表4)。本発明者らは、ここで、心肺移植の61歳の女性における、肝臓および血液中の多量の新規ヒトウイルス(HCV-1)と肝炎との間の時間的な関連性を示す。本患者は、標準的な免疫抑制レジメンを受け、TTVウイルス血症は、高レベルの免疫抑制を支持しなかった。これらの結果は、因果関係に関するヒルの基準において評価されるべきである。Hill AB. The Environment and Disease: Association or Causation? Proc R Soc Med 1965; 58: 295~300。関連性の特異性は、肝生検における網羅的mNGSを使用して、PCRによって検出されたEBVを除くあらゆる他のウイルスの非存在によって実証されたが、肝生検中での低いEBV濃度、同時に起こった血液中でのより高い複製(104.4ゲノムコピー/mL)、および肝生検に対するEBV染色の陰性結果を考慮すると、EBVがそのような細胞融解の原因であるとは考えられなかった。HCV-1は、肝炎を有しない40名の対照においても、既知(50%)または未知(50%)の病因の肝炎を有する16名の対照においても(表3)、qPCRによって証明されなかった。加えて、HCV-1は、mNGSによって調査された、処方時点において未知の病因の57のさらなる肝炎の症例において検出されなかった(未公開の結果、表4)。まとめると、本発明者らは、113名の対照においてHCV-1ゲノムを検出しなかった。【0187】

30

40

50

サーコウイルスはDNAウイルスである。重要なことに、HCirV-1転写物は、2%の肝臓細胞の核において、特異的ISHによって検出された。したがって、ISH結果は、ウイルス発現およびおそらくはウイルス複製と矛盾しなかった。サーコウイルスの溶菌サイクルを考慮すると、この結果は、HCirV-1の、肝細胞を標的とし融解させることによって肝炎の原因となる役割、また、免疫細胞傷害性応答を惹起し得る引き金としての原因的役割を強力に支持する。

【0188】

ブタサーコウイルス(PCV) 1~4などの動物サーコウイルスは、ここでは認められなかった生殖障害、皮膚炎、腎症、および呼吸器疾患の原因となり得る [Siriserewan C、Thanawongnuwech R、Kedkovid R. Current Understanding of the Pathogenesis of Porcine Circovirus 3. Pathogens 2022;11:64;Wang D、Mai J、Yang Y、Xiao C-T、Wang N. Current knowledge on epidemiology and evolution of novel porcine circovirus 4. Veterinary Research 2022;53:38]。サーコウイルスと肝炎との関連性は、ウマにおいて実証されている [Hui A、Altan E、Slovits N、Fletcher C、Deng X、Delwart E. Circovirus in Blood of a Febrile Horse with Hepatitis. Viruses 2021;13:944]。PCV3の仔ブタへの接種後、ウイルス血症は最大108.9コピー/mLまで徐々に増加し、本発明者らの所見を暗示したが、全体的に感染の約21日後(dpi)にピークに達し、本発明者らが同定した、より遅れたピークに反していた。病理学的病変およびPCV3抗原は、肝臓(白灰色の結節および壊死の存在を含み、PCV-3抗原は、肝小葉間質、肝類洞壁(hepatic sinus antral wall)、および類洞の細胞質において検出された(Fujiwara K、Kojima H、Yasui Sら、Hepatitis A viral load in relation to severity of the infection. Journal of Medical Virology 2011;83:201~207)および他の臓器(肺、心臓、腎臓、リンパ節、脾臓、および小腸) [Jiang H、Wang D、Wang Jら、Induction of Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome in Piglets by Infection with Porcine Circovirus Type 3. Journal of Virology 2019;93:e02045]において検出された。興味深いことに、PCV3ウイルス血症は、140dpiにおいても依然として観察することができ [Opriessnig T、Prickett JR、Madson DMら、Porcine circovirus type 2(PCV2)-infection and reinoculation with homologous or heterologous strains: virological, serological, pathological and clinical effects in growing pigs. Vet Res 2010;41:31]、このことは、本患者について記載されているように、サーコウイルスの長期感染を持続する能力を示している。妥当性に関して、薬物性病因についても病理学的証拠についても、時間的関連は存在しなかった。一般的な肝炎ウイルス感染症は除外した。EBVは陽性であったが、EBVウイルス量は約104gc/mLで安定しており(図4)、EBER染色は陰性であったため、EBVの病原体としての役割は除外された。HCirV-1の最初の検出は肝臓病態の前であり、より正確には、第1および第2のウイルス量ピークはそれぞれ、第1および第2の細胞融解ピークの前であり、第3のウイルス量ピークは細胞融解ピークと同時であった(図4)。高ウイルス量のHCirV-1(1010gc/mL)もまた、HCirV-1の、肝炎の原因となる役割を支持している。実際、高ウイルス量と疾患重症度との間の強力な関係は、HBV [Yu SJ、

10

20

30

40

50

Kim YJ. Hepatitis B viral load affects prognosis of hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol 2014; 20: 12039~12044]、HAV [Fujiwara K、Kojima H、Yasui Sら、Hepatitis A viral load in relation to severity of the infection. Journal of Medical Virology 2011; 83: 201~207]、または造血幹細胞移植レシピエントにおけるアデノウイルス [Lion T、Baumgartinger R、Watzinger Fら、Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. Blood 2003; 102: 1114~1120] に関して記載されている。したがって、ウイルス量は臓器病態に影響を与える [Funk GA、Gosert R、Hirsch HH. Viral dynamics in transplant patients: implications for disease. The Lancet Infectious Diseases 2007; 7: 460~472]。今日の時点において、本発明者らは、感染源を同定していない。具体的には、それが動物ウイルスのスピルオーバーによるものなのかどうかも、本例が、明らかとなったヒトウイルスの最初の同定された症例であるのかどうかも不明である。HCirV-1は、ヒトバイロームの一部として同定されたことはこれまでに一度もなかった。本発明者らは、それが動物起源である可能性があり、場合によりE型肝炎ウイルスと同様に食物起源であり得ると予想する。系統解析は、このウイルスを最も近縁の既知のウイルスから離れたところに位置付け、この最も近縁の既知のウイルス自体は、本患者の原因とはなり得ない野生の外来動物を宿主とする。特異的抗体検査の開発は、ウイルスの生態を解明し、感染機構をより良好に理解するのに役立つだろう。

10

20

30

40

50

【0189】

表2に示すように、HCirV-1は、唾液、尿、および便中に排出され、したがって場合により接触者に感染する可能性があるが、これはまだ調査されていない。

【0190】

in situハイブリダイゼーション

ViewRNA ISH Tissue Assay Kit 2-plex (Thermo Fisher Scientific) を使用して、ウイルス複製の特徴としてのHCirV-1のRNA配列を検出した。12種および20種の特注のbDNAプローブのカクテルを、それぞれHCirV-1のカプシドおよびRep遺伝子を標的とするように設計し、これらは赤色シグナルによって(キットの「プローブタイプ1」として)示された。ヒトGAPDH、ACTBおよびPPI転写物を標的とする対照プローブのミックスは、青色シグナルによって(キットの「プローブタイプ6」として)示された。RNA標的を露出させるために、組織切片(キシレンを使用した脱パラフィン処理後)を、20分間の熱前処理および15分間のプロテアーゼ消化によって前処理した。ハリスヘマトキシリンを対比染色のために使用した。ISHのために使用した陰性肝生検対照には、製造業者によって推奨されるHCirV-1に感染した患者由来のプローブなしの陰性対照と、mNGSを用いたHCirV-1に関する検査結果が陰性であった異なる患者由来の陰性対照(このスライドには手順アッセイ全体が行われた)とを含めた。

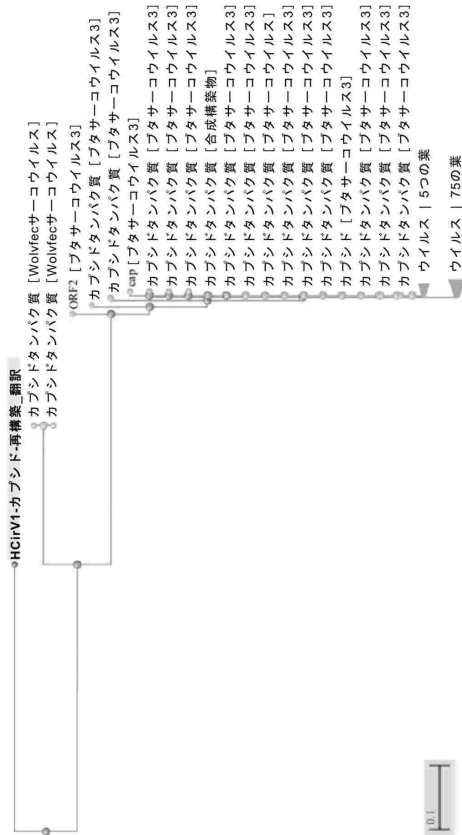
【0191】

in situハイブリダイゼーション(in situ hybridization, ISH)は、肝生検において2%の感染(赤色シグナル)肝細胞を示した(図7)。赤色標識は、核においては強く、細胞質においては弱かった。一部の肝細胞は、核における赤色標識が不十分であり、赤色標識は細胞質においては陰性であった。内皮細胞およびリンパ球は感染しなかった。陰性対照においては、赤色シグナルは記録されなかった。I

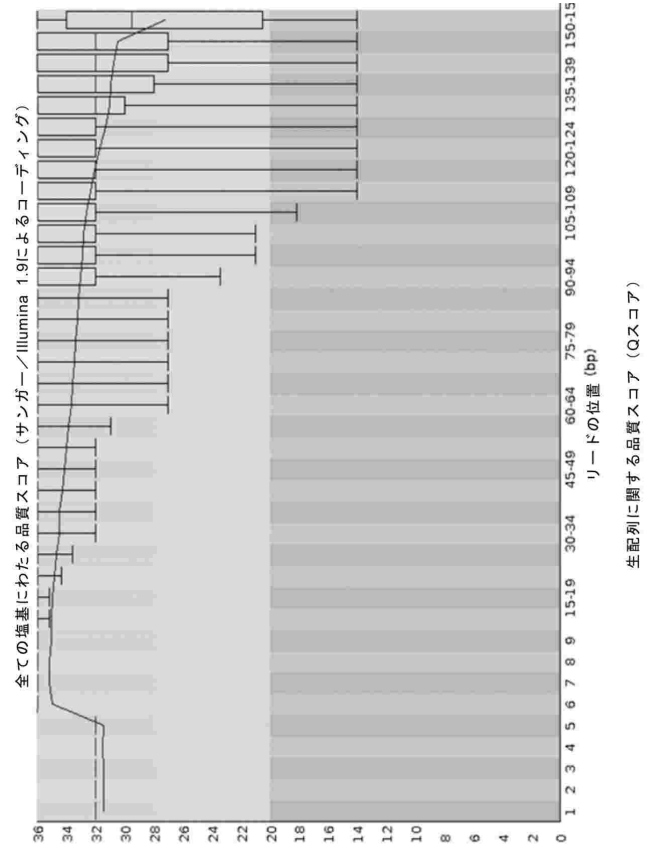
SH による肝臓細胞における H C i r V - 1 発現の検出、他の肝炎病因の排除、ならびに重度の細胞融解と肝臓および血液における非常に多い H C i r V - 1 量との時間的関連性は、因果関係を強力に示唆する。さらに、本発明者らの免疫不全患者（移植レシピエントを含む）において m N G S を使用した経験、およびこれらの患者の代表的なコホートに対して実施した特異的 q P C R は、H C i r V - 1 が、T T V と異なり、片利共生ウイルス叢の一部ではないことを証明する。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

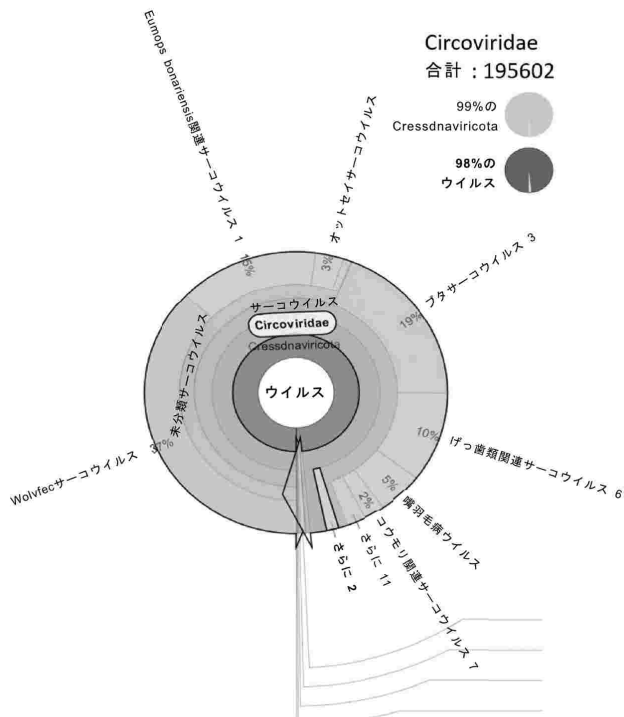
20

30

40

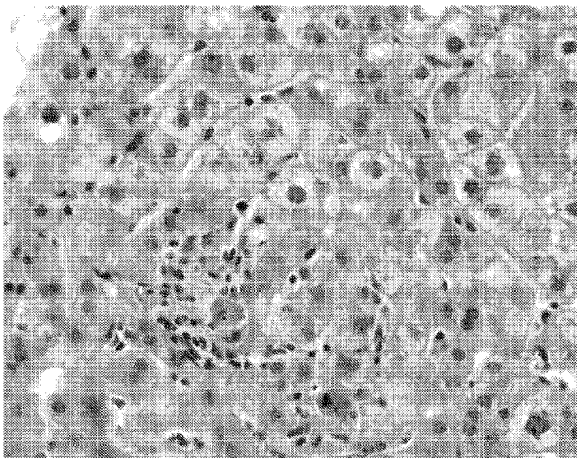
50

【図 3】

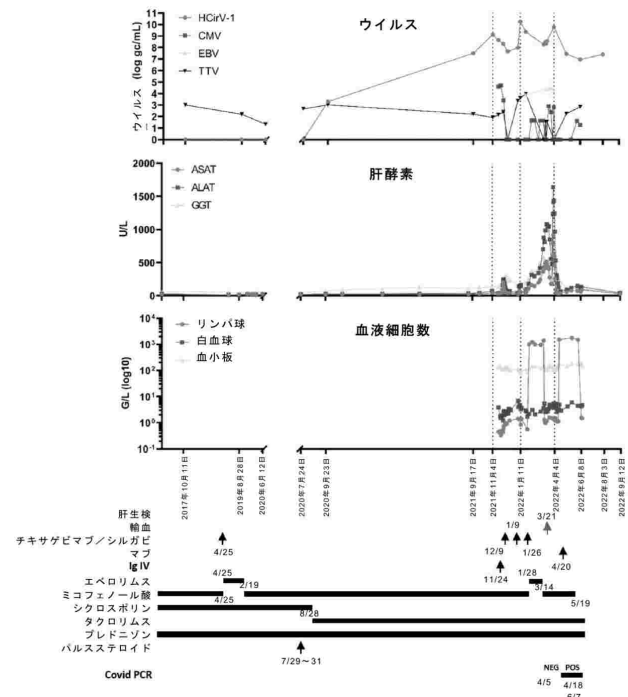


【図 5】

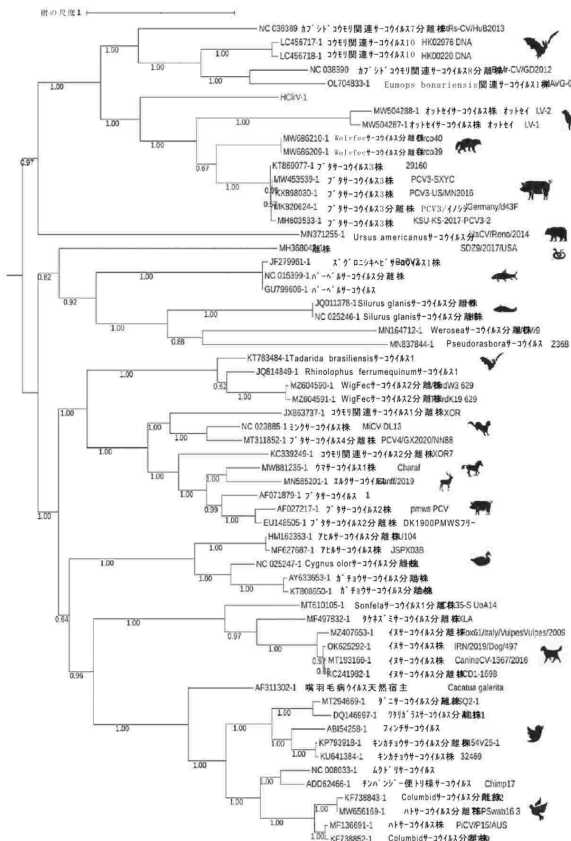
Figure 5



【図 4】

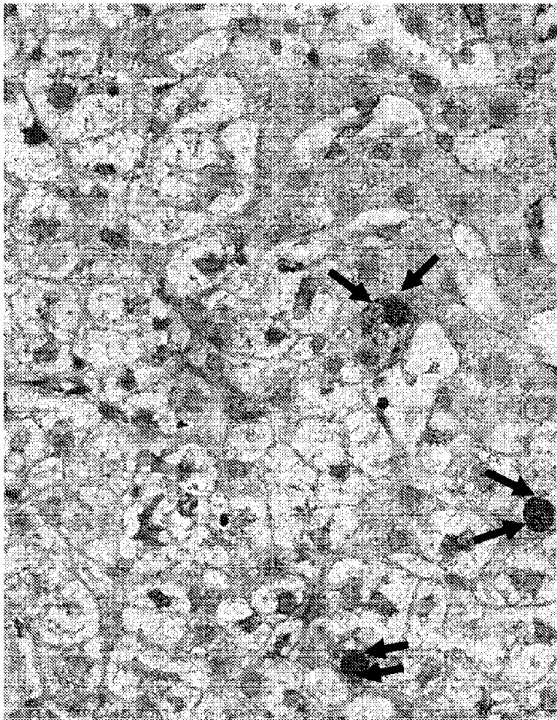


【図 6】



【 図 7 】

Figure 7



【 配 列 表 】

2025516796000001.xml

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6888 C07K14/005
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 C07K

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)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

v 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

13 September 2023

Date of mailing of the international search report

22/09/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-8016

Authorized officer

Celler, Jakub

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2023/000264

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 2020/377945 A1 (ZHAO LIPING [CN] ET AL) 3 December 2020 (2020-12-03) sequence 4410	3, 6, 8 1, 2, 4, 5, 7, 9-21
X A	WO 2019/149247 A1 (PERFECT CHINA CO LTD [CN]) 8 August 2019 (2019-08-08) sequence 4410	3, 6, 8 1, 2, 4, 5, 7, 9-21
X A	CN 109 943 664 A (UNIV TIANJIN) 28 June 2019 (2019-06-28) sequence 2	3, 6, 8 1, 2, 4, 5, 7, 9-21
X A	US 2020/305399 A1 (FUNK DEVAN CHARLES [US] ET AL) 1 October 2020 (2020-10-01) sequence 87922	7, 8 1-6, 9-21
X,P	PÉROT PHILIPPE ET AL: "Circovirus Hepatitis Infection in Heart-Lung Transplant Patient, France", EMERGING INFECTIOUS DISEASES, vol. 29, no. 2, 1 February 2023 (2023-02-01), pages 286-293, XP093081479, US ISSN: 1080-6040, DOI: 10.3201/eid2902.221468 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/artic les/PMC9881760/pdf/22-1468.pdf> the whole document	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2023/000264

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.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2023/000264

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2020377945 A1	03-12-2020	CN 110527717 A TW 201934760 A US 2020377945 A1 WO 2019149247 A1	03-12-2019 01-09-2019 03-12-2020 08-08-2019
WO 2019149247 A1	08-08-2019	CN 110527717 A TW 201934760 A US 2020377945 A1 WO 2019149247 A1	03-12-2019 01-09-2019 03-12-2020 08-08-2019
CN 109943664 A	28-06-2019	NONE	
US 2020305399 A1	01-10-2020	CA 3076930 A1 US 2020305399 A1	26-09-2020 01-10-2020

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	Z
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
	G 0 1 N 33/569	Z

,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,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,
ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,P
H,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,
UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

E-HOPITAUX DE PARIS

フランス国パリ、ブールバール、ディドゥロ、55

(71)出願人 520053762

ユニヴェルシテ・パリ・シテ

UNIVERSITE PARIS CITE

フランス共和国, 75006 パリ, ブールバール サンージェルマン 85

(74)代理人 100120031

弁理士 宮嶋 学

(74)代理人 100120617

弁理士 浅野 真理

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(72)発明者 フィリップ、ペロ

フランス国パリ、アブニュ、デュ、ジェネラル、ルクレール、62

(72)発明者 マルク、エロワ

フランス国パリ、リュ、デュ、シェルシューミディ、91ベ

(72)発明者 ベアトリス、ルニョー

フランス国パリ、リュ、デュ、ドクトール、ルー、28、バティマン、エス、ベイユ、アンステイ
テュ、パストゥール、ラボラトワール、ド、デクーベルト、ド、パソジェヌ

(72)発明者 ニコラ、ダ、ローシャ

フランス国パリ、リュ、デュ、ドクトール、ルー、28、バティマン、エス、ベイユ、アンステイ
テュ、パストゥール、ラボラトワール、ド、デクーベルト、ド、パソジェヌ

(72)発明者 アンヌ、ジャメ

フランス国パリ、リュ、ド、セーブル、149、ユニベルシテ、パリ、シテ

(72)発明者 ジャック、フルゴー

フランス国パリ、リュ、ド、セーブル、149、ユニベルシテ、パリ、シテ

(72)発明者 マリアンヌ、ルリュエービル

フランス国パリ、リュ、ド、セーブル、149、アシスタンス、ピュブリック、オピト、ド、パリ
、オピタル、ネッケル、アンファンマラデ

(72)発明者 アニエス、フェローニ

フランス国パリ、リュ、ド、セーブル、149、アシスタンス、ピュブリック、オピト、ド、パリ
、オピタル、ネッケル、アンファンマラデ

(72)発明者 オリビエ、ロートラリー

フランス国パリ、リュ、ド、セーブル、149、ユニベルシテ、パリ、シテ

(72)発明者 クレール、ルゾー

フランス国パリ、リュ、ド、セーブル、1 4 9、アシスタンス、ピュブリック、オピト、ド、パリ、オビタル、ネッケル、アンファンーマラデ

(72)発明者 デルフィーヌ、クレチアン

フランス国パリ、セデックス、1 5、リュ、デュ、ドクトール、ルー、2 5－2 8、アンスティテュ、パストゥール

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA18 QQ03 QR55 QR62 QS34 QX02

 4C084 AA13 MA66 NA05 NA14 ZB091 ZB092

 4C085 AA03 AA13 AA14 CC22 CC23 DD62 EE01 GG01

 4H045 AA11 AA30 BA10 CA01 DA50 DA89 EA31 FA74