(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0075537
(43) 공개일자 2025년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *C07K 14/005* (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01) *C12Q 1/70* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
C07K 14/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7041932
(22) 출원일자(국제) 2023년05월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년12월18일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2023/000264
(87) 국제공개번호 WO 2023/223092
국제공개일자 2023년11월23일
(30) 우선권주장
63/343,205 2022년05월18일 미국(US)
63/373,343 2022년08월24일 미국(US)

(71) 출원인
앵스띠뛰 파스퇴르
프랑스 파리 75015 뤼 뒤 독뙤르 루 25-28
아시스땅스 퍼블리끄-오삐또 드 빠리
프랑스 75012 파리 불바르 디드로 55
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
빼로, 필립
프랑스, 75014 빠리, 아브뉘 뒤 제네랄 르클레르 62
엘로이, 마끄
프랑스, 75006 빠리, 뤼 뒤 셰르슈-미디 91베
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인오리진

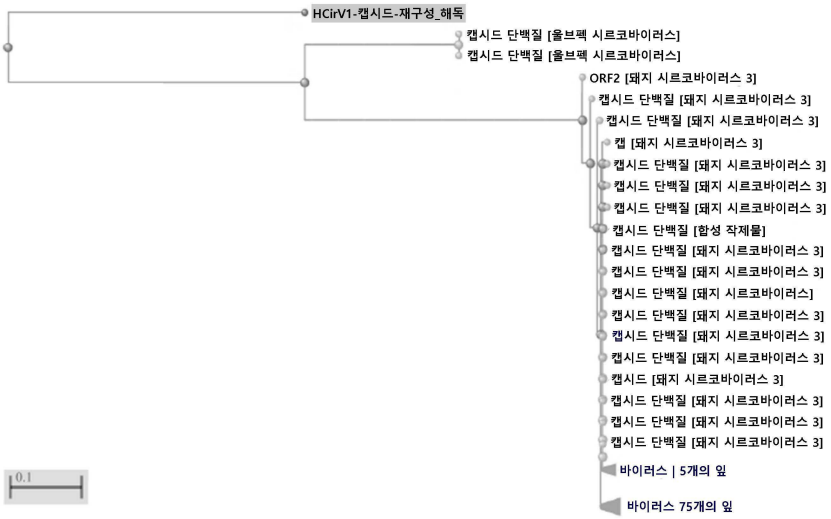
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **인간 시르코바이러스의 확인**

(57) 요 약

본 발명은 인간 간염 환자의 샘플에서 최초 병원성 인간 시르코바이러스의 발견에 관한 것으로, 이 바이러스의 캡시드는 가장 가까운 알려진 시르코바이러스와 아미노산 수준에 있어 단지 39%의 동일성을 보인다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
C12Q 1/701 (2013.01)
C12N 2750/10022 (2013.01)
C12N 2750/10034 (2013.01)

(71) 출원인
유니베르시떼 파리 시테
프랑스 75006 파리 생 제르맹 블러바드 85
에꼴 나씨오날르 베떼히네르 달포르
프랑스 에프-94700 메종 알포르 아브뉘 뒤 제네랄 드 골 7

(72) 발명자
레그노, 베아트리스
프랑스, 75015 파리, 뤼 뒤 독뙤르 루 28, 밧. 에스. 베일, 앵스띠뛰 파스퇴르 라보라뚜와르 드 데꾸베르뜨 드 빠또젠느
다 로샤, 니꼴라
프랑스, 75015 파리, 뤼 뒤 독뙤르 루 28, 밧. 에스. 베일, 앵스띠뛰 파스퇴르 라보라뚜와르 드 데꾸베르뜨 드 빠또젠느
쟈메, 안느
프랑스, 75015 빠리, 뤼 드 세브르 149, 위니베르시떼 빠리 씨떼
푸르조, 쟈끄
프랑스, 75015 빠리, 뤼 드 세브르 149, 위니베르시떼 빠리 씨떼
르휘에즈-빌, 마리안느
프랑스, 75015 빠리, 뤼 드 세브르 149, 오삐딸 네께르 앙팡-말라드, 아시스땅스 퍼블리끄 오삐또 드 빠리
페로니, 아그네스
프랑스, 75015 빠리, 뤼 드 세브르 149, 오삐딸 네께르 앙팡-말라드, 아시스땅스 퍼블리끄 오삐또 드 빠리
로르토라리, 올리비에
프랑스, 75015 빠리, 뤼 드 세브르 149, 위니베르시떼 빠리 씨떼
루조, 끌레르
프랑스, 75015 빠리, 뤼 드 세브르 149, 오삐딸 네께르 앙팡-말라드, 아시스땅스 퍼블리끄 오삐또 드 빠리
크레띠앙, 델핀느
프랑스, 75724 파리 세덱스 15, 뤼 뒤 독뙤르 루, 25-28, 앵스띠뛰 파스퇴르

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 시르코바이러스 1(circovirus 1; HCirV-1) 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 핵산으로서, 상기 서열은 바람직하게는 서열 번호: 10 또는 이의 변이체인, 재조합 핵산.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 뉴클레오타이드 서열은 HCirV-1 캡시드 또는 레플리카제 서열인, 재조합 핵산.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 뉴클레오타이드 서열은, 서열 번호: 1의 캡시드 뉴클레오타이드 서열 또는 서열 번호: 11의 레플리카제 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 변이체 또는 이의 적어도 10개의 연속적인 뉴클레오타이드의 단편을 포함하는, 재조합 핵산.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뉴클레오타이드 서열은, 서열 번호: 2, 서열 번호: 12, 서열 번호: 16, 또는 서열 번호: 17과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 단백질을 암호화하는, 재조합 핵산.

청구항 5

진단 시약으로서 단리된 HCirV-1 핵산의 시험관 내(*in vitro*) 용도로서, 상기 핵산은 바람직하게는 서열 번호: 10, 서열 번호: 1, 또는 서열 번호: 11의 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 적어도 10개의 연속적인 뉴클레오타이드의 단편을 포함하는, 용도.

청구항 6

서열 번호: 1의, 또는 서열 번호: 10 또는 서열 번호: 11의 임의의 서열의 적어도 10개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하는 프라이머 또는 프로브.

청구항 7

제6항에 있어서,

서열 번호: 4 내지 9 또는 서열 번호: 13 내지 15 중에서 선택된 서열을 가지고, 바람직하게는 형광성, 방사활성, 또는 효소적 표지(label)로 표지된, 프라이머 또는 프로브.

청구항 8

제6항 또는 제7항의 프라이머 또는 프로브, 및 증폭 및/또는 하이브리드화 시약을 포함하는, 키트.

청구항 9

진단 검정(diagnostic assay)에서의, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 재조합 핵산의, 또는 제6항 또는 제7항의 프라이머 또는 프로브의, 제8항의 키트의 시험관 내(*in vitro*) 용도.

청구항 10

HCirV-1 바이러스의 시험관 내(*in vitro*) 검출 방법으로서, 제6항 또는 제7항의 프라이머 또는 프로브를 생물학

적 샘플과 접촉시키는 단계, 및 샘플에서 HCirV-1 핵산의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하는, 시험관 내(*in vitro*) 검출 방법.

청구항 11

진단 시약으로서 단리된 HCirV-1 단백질 또는 펩타이드의 시험관 내(*in vitro*) 용도로서, 상기 단백질 또는 펩타이드는 바람직하게는 서열 번호: 2, 서열 번호: 12, 서열 번호: 16, 서열 번호: 17 또는 이의 단편 또는 변이체를 가지는, 시험관 내(*in vitro*) 용도.

청구항 12

백신으로서 사용하기 위한 단리된 HCirV-1 단백질 또는 펩타이드로서, 상기 단백질 또는 펩타이드는 바람직하게는 서열 번호: 2, 서열 번호: 12, 서열 번호: 16, 또는 서열 번호: 17, 또는 이의 단편 또는 변이체를 가지는, 단리된 HCirV-1 단백질 또는 펩타이드.

청구항 13

서열 번호: 2, 또는 서열 번호: 12, 또는 서열 번호: 16, 또는 서열 번호: 17, 또는 이의 변이체의 적어도 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 또는 50개의 아미노산을 포함하는 단리된 단백질 또는 펩타이드.

청구항 14

진단제로서의, 서열 번호: 2, 또는 서열 번호: 12, 또는 서열 번호: 16, 또는 서열 번호: 17, 또는 이의 변이체의, 적어도 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 또는 50개 아미노산을 포함하는 단리된 단백질 또는 펩타이드의 시험관 내(*in vitro*) 용도.

청구항 15

백신으로서 사용하기 위한, 서열 번호: 2, 또는 서열 번호: 12, 또는 서열 번호: 16, 또는 서열 번호: 17, 또는 이의 변이체의, 적어도 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 또는 50개의 아미노산을 포함하는, 단리된 단백질 또는 펩타이드.

청구항 16

HCirV-1 단백질 또는 펩타이드에 특이적으로 결합하는 단리된 항체로서, 상기 단백질 또는 펩타이드는 바람직하게는 서열 번호: 2, 서열 번호: 12, 서열 번호: 16, 또는 서열 번호: 17, 또는 이의 단편 또는 변이체를 가지는, 단리된 항체.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 단백질은 서열 번호: 2, 서열 번호: 12, 서열 번호: 16, 또는 서열 번호: 17의 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체를 가지는, 단리된 항체.

청구항 18

진단 검정(diagnostic assay)에서 항원으로서의 HCirV-1 바이러스 단백질의 시험관 내(*in vitro*) 용도로서, 상기 단백질은 바람직하게는 서열 번호: 2, 서열 번호: 12, 서열 번호: 16, 또는 서열 번호: 17 또는 이의 단편 또는 변이체를 가지는, 시험관 내(*in vitro*) 용도.

청구항 19

백신에서 항원으로 사용하기 위한 HCirV-1 바이러스 단백질로서, 상기 단백질은 바람직하게는 서열 번호: 2, 서열 번호: 12, 서열 번호: 16, 또는 서열 번호: 17, 또는 이의 단편 또는 변이체를 가지는, HCirV-1 바이러스 단백질.

청구항 20

제13항의 단백질 또는 펩타이드, 또는 제16항 또는 제17항의 단리된 항체를 생물학적 샘플과 접촉시키는 단계,

및 샘플에서 HCirV-1 단백질 또는 항체의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하는, HCirV-1의 시험관 내(*in vitro*) 검출 방법.

청구항 21

제13항의 단백질 또는 펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물 또는 백신 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생물학적 샘플에서 인간 시르코바이러스(circovirus)의 적어도 하나의 핵산 또는 단백질 또는 이에 대한 항체의 존재를 결정하는 단계를 포함하는 인간 시르코바이러스 감염의 검출 또는 진단에 관한 것이다. 본 발명은 또한 바이러스 핵산 또는 단백질, 특히 핵산 프라이머(primer) 및 프로브(probe), 항원 및 항체로부터 유래된 다양한 진단제, 및 시르코바이러스 바이러스 감염 및 관련된 질환, 특히 간염의 진단을 위한 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 시르코바이러스 감염 및 관련된 질환, 특히 간염의 예방을 위한 백신으로서 바이러스 단백질로부터 유래된 항원에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 시르코바이러스는 ~2 kb의 환형의 단일-가닥(single-stranded) DNA 게놈을 지닌 시르코비리다에(*Circoviridae*) 과(family)의 작은 바이러스이다(Hui et al., Viruses 2021, 13, 944). 시르코바이러스는 조류, 포유동물, 파충류, 및 어류에서 치명적인 질환에 대한 다양한 무증상과 관련되어 있다. *Id.* 병원성인 인간 시르코바이러스는 이전에 기술되어 있지 않았다.

[0003] 인간 간염은 높은 사망률과 관련된 전세계적으로 수백만의 사람에게 영향을 미치는 건강 문제를 나타내는 잠재적으로 치명적인 질환이다. A형 간염 바이러스(HAV)는 급성의 자가-제한 간염을 유발하며, 모든 간영양 바이러스(hepatotropic virus)(B, C, D, 및 E형 간염 바이러스(HBV, HCV, HDV, 및 HEV))는 만성 감염을 일으킬 수 있다. CDC에 따르면, 알려진 바이러스에 이해 유발되는 것으로 진단되지 않은 급성 간염은 일부 의약, 약물, 알코올, 및 독소에 대한 노출"에 의해 유발될 수 있다. 비-바이러스 감염의 다른 가능한 원인은 오염된 물 또는 음식, 식이(dietary) 및 약초 보충물(herbal supplement), 전통적이거나 가정 의약, 야생에서 성장하는 버섯 및 식물, 및 금속, 용매, 페인트 희석제(paint thinner), 또는 살충제와 같은 화학물질을 포함한다(Investigation of Acute Non-Viral Hepatitis of Unknown Etiology Potentially Associated with an Alkaline Water Product, CDC, 2021). 또한, 여전히 알려지지 않은 바이러스가 연루될 수 있다. 따라서, 진단의 관련성은 질환의 적절한 관리에 필수적이다. 이러한 맥락에서, 간염에 관여하는 새로운 병원체(pathogen)를 확인하는 것에 대한 당해 분야에서의 필요성이 존재하며, 이는 가능한 진단 시험의 범위를 개선하고 진단 효율을 증가시킬 것이다. 본 발명은 당해 분야에서의 이러한 필요성을 충족시킨다.

발명의 내용

[0004] 발명의 상세한 설명

[0005] 신규의 인간 시르코바이러스를 인간 간염 환자로부터의 샘플에서 확인하였다. 신규의 인간 시르코바이러스의 캡시드는 가장 가까운 시르코바이러스인, 울브펙 시르코바이러스(Wolvfec circovirus), 진뱅크(Genbank) QSX73454와 아미노산 수준에서 단지 39%의 동일성을 나타낸다. 캡시드 유전자의 계통발생적 분석은 시르코바이러스 속 구성원 내 새로운 계통분기에 상응한다.

[0006] 바이러스학적 및 임상적 데이터의 수렴(convergence)은 본 발명자가 프랑스에서 지금까지 동물 병원체에 의해서만 나타난 바이러스의 그룹에 속하는 새로운 간영양성 바이러스(hepatotropic virus)를 확인하였음을 나타낸다. HCirV-1은 인간, 또는 심지어 다른 척추동물에서 간염 또는 다른 질환의 덜 중증의, 표지되지 않은 형태의 간염 또는 다른 질환에 관여할 수 있다.

[0007] HCirV-1 DNA 및 단백질 서열의 고유한 특성은 다른 시르코바이러스 속 구성원을 증폭시키거나 검출하지 않는 인간 시르코바이러스에 대해 특이적인 재조합 핵산, 발현 벡터, 프라이머, 펩타이드, 프로브, 항체, 면역원성 조성물의 생성, 및 키트(kit)와 진단 검정을 허용한다.

[0008] 재조합 핵산

[0009] 본 발명은 HCirV-1 핵산 서열을 포함하는 재조합 핵산을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 재조합 핵산은 HCirV-1 캡시드 또는 레플리카제 서열을 포함한다.

[0010] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 재조합 핵산은 다음의 핵산 서열을 포함하거나 이로 이루어지며, 이는 HCirV-1의 캡시드 단백질 및 레플리카제 단백질을 암호화(encoding)하는, HCirV-1의 전체 게놈에 상응한다:

[0011] CAGTATTACCCGGCACCTCGGAACCTGGAACCAGGAGCAAGATAGAGGTTTTCAGGTGTGGCACTTGGCAGCCTATCAAGATGGATGGACCCGCCAAAAAGA
GCAAGGTGCTGTATGGTGTTCCTGTGGCAGTGCCGGGTCTGAATGTGAAATATGTTTTTGCTGATAATGTATTGTACTGGCATTGTGATGACTGTTATAAGT
TTTGGCTGGATGAGAAGGAGATTCAATCTTATGTGTATTTGGATGCAGCGGGAGAGCCCAGTGGCGAGGTGGTGTTTTACGATAAACAACTGGACCCAAGAA
GAGTTGGATTGCTTGCTGCAGTGTGGCAAAGAGAAAGCGAAGTATCTTTGTATCGGCAGAGAGGTTGGAAGCGGCGGTACCCGGCACTTGCAAGGATACGTG
AATTTCAAGAACAAGCGAAGAATGAGACAGGTAAAGGCCTTGCCTGGTTTTATGCGTGCTCACTTAGAAGCGGCCAAGGGGACCGAGAAGCAGGCGAGCGAC
TACTGCAAGAAAGACGGCGATTACCTGGAGATTGGAGAGAGTGGCTGTGCGGGGCGCCGACTGGATTTGGAGACAGCAGCGAAGATACTGACTGAGTCTGGC
GGGAACTTGAAGTGTGTTGCCGAGGCTTGTCCCGGGGTTTATATAAAGTATGGGCGGGGTTTGAGGGATTACGCAAGTGTTATGAAATTAAAGCAACCTCGC
AATTTTAAGAGTACTGTGATTGTTATATGTGGGGATCCTGGTTGTGGGAAAACTAGATATGTTATGGAGGATTGTAGGGAGAAAGGGTTAAGCATGTATTGG
AAGCCAAGGGGAATTTGGTGGGATGGCTATGATGGGGAGGATGTGGTGGTGTATGATGATTTTTATGGGTGGGTTCCTTATGATGAGATGTTGAGGGTTATG
GATAGGTATCCTTTGAAGGTTCCTGTTAAGGGGGGTTATGTGGATTTTACATCTAAGATTATATATGTGACAAGTAATGTGAAGCCTGAGGATTGGTATAGT
AGTGAGAATATTAAGGGGAAGTTGGAGAGTTTGTTTAGGCGGATCAATGTTTATCTGGAGGGTTTTGGCGGGGAGATCCGTGTGGGAACGCCTCTGTATCCT
ATTAACTATTAATAAAGACAAACAATGGTTGAAGTTCAACGGTTTGTTTATTTGGCGGGTACAATTGGCGGGAAGGAGGGAAAAATGGCGGGAGTTACTGAC
TGGGCCGCACAGCCGCCGCGGGGGTCCCCGACAGGGTCGGGGCGCGGGGGATCTTTTCCGGCCGCCCCGTTAGGGCAGGAAAAGCGTTTACCTGGTCACTTG
GGGCGGGTCACCCCCCTCGGAGTCAGTTTATATAAGTTTGCTTAGAGAAGGTATTTCCATTTGATCCAGGCTGATTTGATGAGCCAGTATCTGACTGGTTGA
TTATATTCAACGTAATGAGAGTACTTGAGTCCTCCCCATTTGACAGTAGATTCTGCAGAGTTCCACCAGGTTCTGCGTGGGAGGAGAGCTGATGCTTGAGAA
GAAGTAGTATTGCCAGTAAGATGGATGAGAGGGCGAGGAGTAAAATATCTGCTATGCTTTCTGTTAGCCTTCCAAAGTCTGGAAGTGGCAGTGTTGCAGAGT
AGGTTTGATTGTACTGTGTTAGGTTCATTCCAGGGTCCATCCAGGTCTATGATGGTGTTTCCTATAGGCCAGTAGTTCATTCGCTGTGTGGCATTGAAGGGA
AGGAAGGTTAGTTTGAGTTTTAGGATTTTATAAAAGTCCCAGCCTGGTGAGGAAACCCATTCACTGAGGGTGGTTGTGTAAGAGCCTTGCATCCATTTTTTG
GCATTGGTTGAATCTTGGTTTTGGAGGGTGAAGGGTTCAGTCTTGCAAAATTTTTGGACAACTGTTCCATTATTGGTGGGACGTCTTATGTAAATGCGGCGT
CTCCTGATTCGTCGAAATCTGCGGGCACGCCTCCTGGGGCGGGGTCTTCTCCTCCTGAGGGT ATATCTAGCCATGGTGCCGGT (서열 번호:10)

[0012] 이 서열은 현재 수탁 번호 제ON677309호 하에 등록되었다.

[0013] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 서열 번호: 10과 65%, 70%, 80%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상의 동일성(identity)을 갖는 이의 변이체를 포함한다.

[0014] 특수한 변이체는 예를 들면, 이의 서열이 수탁 번호 제ON226770호 및 제OP744467호 하에 최근 등록된 hCirV-2 바이러스이다(Li et al, Emerging Infectious Diseases, vol.29, published on May 5, 2023). 이러한 변이체는 서열 번호: 10과 각각 68% 및 79% 동일성을 공유한다.

[0015] 본 발명의 재조합 핵산은 뉴클레오타이드 서열 서열 번호: 10과 동일한 모두 또는 적어도 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, 또는 2000개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0016] 특수한 실시양태에서, 본 발명의 재조합 핵산은 다음의 핵산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 이는 HCirV-1의 캡시드 단백질을 암호화하는 HCirV-1의 서열에 상응한다:

[0017] ATGGCTAGATATACCCTCAGGAGGAGAAGACCCCGCCCCAGGAGGCGTGCCCGCAGATTTCGACGAATCAGGAGACGCCGCATTTACATAAGACGTCCCACC
AATAATGGAACAGTTGTCCAAAAATTTTGCAAGACTGAACCCTTCACCCTCCAAAACCAAGATTCAACCAATGCCAAAAAATGGATGCAAGGCTCTTACACA
ACCACCCTCAGTGAATGGGTTTCCTCACCAGGCTGGGACTTTTATAAAATCCTAAAACTCAAACTAACCTTCCTTCCCTTCAATGCCACACAGCGAATGAAC
TACTGGCCTATAGGAAACACCATCATAGACCTGGATGGACCCTGGAATGAACCTAACACAGTACAATCAAACCTACTCTGCAACACTGCCACTTCCAGACTT
TGGAAGGCTAACAGAAAGCATAGCAGATATTTTACTCCTCGCCCTCTCATCCATCTTACTGGCAATACTACTTCTTCTCAAGCATCAGCTCTCCTCCCACGC
AGAACCTGGTGGAACTCTGCAGAATCTACTGTCAAATGGGGAGGACTCAAGTACTCTCATTACGTTGAATATAATCAACCAGTCAGATACTGGCTCATCAAA
TCAGCCTGGATCAAATGGAAATACCTTCTCTAA (서열 번호: 1).

[0018] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 서열 번호: 1과 65%, 70%, 80%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 본 발명의 재조합 핵산은 서열 번호: 1의 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90,

100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 또는 600개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하는, 서열 번호: 1의 단편을 포함한다.

[0020] 다른 실시양태에서, 재조합 핵산은 HCirV-1의 레플리카제 단백질을 암호화하는, 다음의 핵산 서열을 포함하거나 또는 이로 이루어진다:

[0021] ATGCAGCGGGAGAGCCCAGTGGCGAGGTGGTGTTTTACGATAAACAACTGGACCCAAGAAGAGTTGGATTGCTTGCTGCAGTGTGGCAAAGAGAAAGCGAAG
TATCTTTGTATCGGCAGAGAGGTTGGAAGCGGCGGTACCCGGCACTTGCAAGGATACGTGAATTTCAAGAACAAGCGAAGAATGAGACAGGTAAAGGCCTTG
CCTGGTTTTATGCGTGCTCACTTAGAAGCGGCCAAGGGGACCGAGAAGCAGGCGAGCGACTACTGCAAGAAAGACGGCGATTACCTGGAGATTGGAGAGAGT
GGCTGTGCGGGGCGCCGACTGGATTTGGAGACAGCAGCGAAGATACTGACTGAGTCTGGCGGGAACTTGAAGTGTGTTGCCGAGGCTTGTCCCGGGGTTTAT
ATAAAGTATGGGCGGGGTTTGAGGGATTACGCAAGTGTTATGAAATTAAAGCAACCTCGCAATTTTAAGAGTACTGTGATTGTTATATGTGGGGATCCTGGT
TGTGGGAAAACTAGATATGTTATGGAGGATTGTAGGGAGAAAGGGTTAAGCATGTATTGGAAGCCAAGGGGAATTTGGTGGGATGGCTATGATGGGGAGGAT
GTGGTGGTGTATGATGATTTTTATGGGTGGGTTCCTTATGATGAGATGTTGAGGGTTATGGATAGGTATCCTTTGAAGGTTCCTGTTAAGGGGGGTTATGTG
GATTTTACATCTAAGATTATATATGTGACAAGTAATGTGAAGCCTGAGGATTGGTATAGTAGTGAGAATATTAAGGGGAAGTTGGAGAGTTTGTTTAGGCGG
ATCAATGTTTATCTGGAGGGTTTTGGCGGGGAGATCCGTGTGGGAACGCCTCTGTATCCTATTA ACTATTAA (서열 번호:11)

[0022] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 서열 번호: 11과 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상의 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함한다.

[0023] 본 발명의 재조합 핵산은 뉴클레오타이드 서열 서열 번호: 11과 동일한 모두 또는 적어도 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 또는 850개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0024] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 재조합 핵산은 세균 또는 효모의 복제를 위한 오리진(origin) 또는 복제를 포함한다.

[0025] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 재조합 핵산은 이종 프로모터 또는 인핸서(enhancer)와 같은, 발현을 허용하는 이종 서열을 포함한다.

[0026] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 재조합 핵산은 HCirV-1의 캡시드 단백질의 다음의 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 암호화한다:

[0027] MARYTLRRRRPRPRRRARRFRRIRRRRIYIRRPTNNGTVVQKFCKTEPFTLQNQDSTN
AKKWMQGSYTTTLSEWVSSPGWDFYKILKLKLTFLPFNATQRMNYWPIGNTIIDLDGP
WNEPNTVQSNLLCNTATSRLWKANRKHSRYFTPRPLIHLTGNTTSSQASALLPRRTW WNSAESTVKWGGLKYSHYVEYNQPVRYWLIKSAWIKWKYLL
(서열 번호: 2).

[0028] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 재조합 핵산은 서열 번호: 2와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 단백질을 암호화한다.

[0029] 다른 실시양태에서, 본 발명의 재조합 핵산은 HCirV-1의 레플리카제 단백질의 다음의 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 암호화한다:

[0030] MQRESPVARWCFTINNWTQEELDCLLQCGKEKAKYLCIGREVGSGGTRHLQGYVNFKNKRRMRQVKALPGFMRAHLEAAKGTEKQASDYCKKDGDYLEIGES
GCAGRRLDLETAAKILTESGGNLKCVAEACPGVYIKYGRGLRDYASVMKLKQPRNFKSTVIVICGDPGCGKTRYVMEDCREKGLSMYWKPRGIWWDGYDGED
VVVYDDFYGWVPYDEMLRVMDRYPLKVPVKGGYVDF TSKIIYVTSNVKPEDWYSSENIKGKLESLFRRINVYLEGFGGEIRVGTPLYPINY (서열 번호:12).

[0031] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 재조합 핵산은 서열 번호: 2 또는 서열 번호: 12 중 어느 것과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 단백질을 암호화한다.

[0032] 발현 벡터

[0033] 본 발명은 HCirV-1 단백질의 발현을 위한 재조합 벡터를 포함한다. 재조합 벡터는 진핵세포 또는 원핵세포 발현을 위한 벡터, 예를 들면, 플라스미드, 세균 도입을 위한 파아지, 효모를 형질전환시킬 수 있는 YAC, 바이러스 벡터 및 필수적으로 레트로바이러스 벡터, 또는 임의의 발현 벡터일 수 있다. 시험관 내(*in vitro*) 또는 생체 내(*in vivo*)에서 HCirV-1 단백질 또는 폴리펩타이드의 생산이 가능한 본원에 정의된 바와 같은 발현 벡터를 선택한다.

[0034] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 발현 벡터는 서열 번호: 2 또는 서열 번호: 12와 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 지닌 단백질을 암호화한다.

[0035] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 발현 벡터는 서열 번호: 2 또는 서열 번호: 12에서의 서열 중 어느 것과 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 지닌 단백질을 암호화한다.

[0036] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 발현 벡터는 단백질 정제 태그(purification tag)를 암호화한다. 하나의 실시양태에서, 발현 벡터는 HCirV-1 단백질 암호화 서열과 단백질 정제 태그, 예를 들면, 폴리His 태그 사이에 삽입된, TEV 절단 부위와 같은 단백질 절단 부위를 암호화한다. 바람직한 실시양태에서, 발현 벡터는 His 태그를 암호화한다. 하나의 실시양태에서, 프로테아제 절단 부위는 예를 들면, 정제 후, His 태그를 제거하기 위해 위치한다.

[0037] 본 발명의 발현 벡터는 전사 조절 영역(예를 들면, 프로모터, 인핸서, 리보솜 결합 부위(ribosome binding site; RBS), 폴리A 신호), 종결 신호, 원핵세포 또는 진핵세포 복제 오리진 및/또는 선택 유전자를 포함할 수 있다. 프로모터의 특징은 필요한 발현의 측면, 즉, 구성적, 일시적 또는 유도성(예컨대, IPTG), 강 또는 약, 조직-특이적인 및/또는 발달 단계-특이적인 프로모터에서 당해 분야의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 벡터는 또한 조건적 발현을 가능하게 하는 서열, 예를 들면, Cre/Lox 시스템 또는 유사 시스템의 서열을 포함할 수 있다.

[0038] 다양한 실시양태에서, 본 발명의 발현 벡터는 플라스미드, 세균 도입을 위한 파아지, 효모를 형질전환시킬 수 있는 YAC, 바이러스 벡터, 또는 임의의 발현 벡터이다. 본원에 정의된 바와 같은 발현 벡터는 시험관 내 또는 생체 내에서 단백질 또는 폴리펩타이드의 생산을 가능하도록 선택된다.

[0039] 본 발명에 따른 핵산 분자 또는 벡터는 문헌: Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc., 미국 의회도서관)에 기술된 것과 같은 표준 프로토콜에 따라, 공지된 통상의 방법으로 수득할 수 있다. 예를 들면, 이는 PCR 또는 RT-PCR에 의한 핵산의 증폭에 의해 또는 대안적으로 전체 또는 부분적 화학 합성에 의해 수득할 수 있다.

[0040] 본 발명의 벡터는 그 자체로 공지된 통상의 재조합 DNA 및 합성 가공 방법에 의해 작제되어 숙주 세포로 도입될 수 있다. 목적한 핵산 분자가 삽입되어 이를 숙주 세포에 도입하고 유지할 수 있는 다수의 벡터가 공지되어 있고; 적절한 벡터의 선택은 이러한 벡터에 대해 예상된 용도(예를 들면, 목적한 서열의 복제, 이러한 서열의 발현, 염색체외 형태로 서열의 유지 또는 대안적으로 숙주의 염색체 물질 내로 통합), 및 숙주 세포의 특성에 의존한다.

[0041] 본 발명은 추가로 본 발명의 벡터를 포함하는 세포를 포함한다.

[0042] 본 발명은 또한 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 세포를 배양하는 단계 및 발현된 단백질을 회수하는 단계를 포함하여, 단백질을 제조하는 방법을 포함한다.

[0043] 본 발명은 본 발명의 핵산으로부터 이러한 방법에 의해 생산된 단백질을 추가로 포함한다.

[0044] 프라이머 및 프로브

[0045] 본 발명은 상기 기술된 바와 같은, 본 발명의 HCirV-1 핵산 서열을 기반으로 하는 프라이머 및 프로브를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 프라이머 및 프로브는 HCirV-1 캡시드 및 레플리카제 서열을 기반으로 한다.

[0046] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 프라이머 및 프로브는 서열 번호: 1의 뉴클레오타이드 서열에 대해 동일한 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 100, 또는 150개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

[0047] HCirV-1 핵산 서열의 증폭을 위한 바람직한 프라이머는:

[0048] HCirV1-Fw1 : ACCTGGATGGACCCTGGAAT (서열 번호: 4),

[0049] HCirV1-Rv1 : AGAGTTCCACCAGGTTCTGC (서열 번호: 5),

[0050] HCirV1-Fw2 : TTCGACGAATCAGGAGACGC (서열 번호: 6),

[0051] HCirV1-Rv2 : GGCAGTGTTGCAGAGTAGGT (서열 번호: 7),

[0052] HCirV1-Fw3 : CAGGAGACGCCGCATTTACA (서열 번호: 8), 및

[0053] HCirV1-Rv3 : CCCATTCACTGAGGGTGGTT (서열 번호: 9)이다.

[0054] 이러한 PCR 프라이머 쌍의 3개의 세트(서열 번호: 4 및 5; 서열 번호: 6 및 7 및 서열 번호: 8 및 9)는 짧은(<500 nt) 단편을 증폭시키기 위하여 캡시드 유전자 내에서 설계되었다(즉, 6개의 개개 프라이머는 3개의 전방 프라이머(forward primer) 및 3개의 역방 프라이머(reverse primer)에 상응한다). 이러한 시르코바이러스가 작은 환형 DNA 바이러스임을 고려할 때, 이러한 프러아미는 또한 긴(>500 nt) 단편을 증폭시키기 위한 역 PCR 실험을 위해 다양한 조합으로 사용될 수 있다. 대안적으로, Phi29 폴리머라제와 같은 대체 증폭 효소가 게놈 증폭, 검출 및 게놈 피니싱(genome finishing)에 사용될 수 있다.

[0055] HCirV-1의 증폭 또는 표지를 위한 다른 바람직한 TaqMan 프라이머 및 프로브는 다음과 같다:

[0056] HCirV-Fw : 5'-TTAGAAGCGGCCAAGGGGA-3' (서열 번호:13)

[0057] HCirV-Rv : 5'-CGCTGCTGTCTCCAAATCCA-3' (서열 번호:14)

[0058] HCirV-Pb : 5'-[FAM]GGAGATTGGAGAGAGTGGCTG[BHQ1]-3' ([FAM]- 서열 번호:15-[BHQ])

[0059] 이들 프라이머 및 프로브의 서열을 설계하여 다른 비-인간 시르코바이러스를 검출하지 않고 인간 시르코바이러스의 레플리카제 단백질을 구체적으로 검출하였다. 수득되는 앰플리콘은 크기가 약 120개 염기쌍이다.

[0060] 바람직하게는, 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 형광성, 방사활성, 또는 효소 표지(label)로 표지된다.

[0061] 본 발명의 프라이머 및/또는 프로브는 뉴클레오타이드 서열 서열 번호: 10 또는 서열 번호: 11 중 어느 것에 대해 동일한 모두 또는 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 100, 또는 150개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함할 수 있거나 또는 이로 이루어진다.

[0062] 본 발명의 프라이머 및/또는 프로브는 서열 번호; 4 내지 9 또는 서열 번호: 13 내지 15의 모든 또는 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 21개를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

[0063] 본 발명은 진단 검정에서 사용하기 위한 본 발명의 프라이머 및 프로브 및 이러한 검정에서 이의 용도를 포함한다.

[0064] 핵산 검출 및 증폭 키트

[0065] 본 발명은 상기 개시된 것과 같은, 본 발명의 프로브 및/또는 프라이머를 함유하는 핵산 검출 및 증폭 키트를 포함한다.

[0066] 바람직하게는, 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 형광성, 방사활성, 또는 효소 표지로 표지된다.

[0067] 바람직하게는, 본 발명의 키트(kit)는 증폭 및/또는 하이브리드화 시약을 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 키트는 dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP), 완충제, 및 역 전사효소(reverse transcriptase) 및/또는 열-안정성 폴리머라제(예를 들면, Taq 폴리머라제)를 함유할 수 있다.

[0068] 핵산 진단 검정

[0069] 본 발명은 본 발명의 프로브 및/또는 프라이머를 활용한 핵산 진단 검정을 포함한다.

[0070] 본 발명은 HCirV-1의 특정 검출을 위한 방법을 포함한다.

[0071] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법은 샘플을 제공하는 단계, 샘플을 본 발명의 프로브와 접촉시키는 단계 및 당해 분야의 통상의 기술에 의해 샘플에서 HCirV-1 핵산의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함한다.

[0072] 하나의 실시양태에서, 샘플은 검출용 샘플에서 HCirV-1 핵산의 양을 증가시키기 위해 증폭 반응에 적용시킬 수 있다.

[0073] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법은 샘플을 제공하는 단계, 임의로 샘플을 역 전사 반응에 적용시켜 HCirV-1 RNA에 대해 특이적인 "역 프라이머"를 사용하여 샘플에서 HCirV-1 RNA의 cDNA 카피(copy)를 생성시키는 단계, "역방 프라이머" 및 "전방 프라이머"를 지닌 HCirV-1 DNA를 증폭시키는 단계, 및 임의의 증폭된 생성물을 검출시키는 단계를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 증폭된 생성물은 프로브로 검출된다. 방법은 샘플에 HCirV-1이 존재하는지의 여부를 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0074] HCirV-1 핵산 서열의 증폭을 위한 바람직한 프라이머 세트는:

[0075] HCirV1-Fw1 (서열 번호: 4)와 HCirV1-Rv1 (서열 번호: 5),

[0076] HCirV1-Fw2 (서열 번호: 6)와 HCirV1-Rv2 (서열 번호: 7), 및

[0077] HCirV1-Fw3 (서열 번호: 8)와 HCirV1-Rv3 (서열 번호: 9) 이다.

[0078] 다른 바람직한 프라이머 세트는:

[0079] HCirV-Fw : 5'-TTAGAAGCGGCCAAGGGGA-3' (서열 번호:13)

[0080] HCirV-Rv : 5'-CGCTGCTGTCTCCAAATCCA-3' (서열 번호:14) 이다.

[0081] 본 발명의 검정의 바람직한 실시양태에서, 샘플은 생물학적 샘플, 예를 들면, 대변, 타액, 혈액, 혈장, 혈청, 뇨, 뇌척수액, 또는 조직, 바람직하게는 간, 샘플이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 인간 또는 동물 임상 샘플(즉, 시르코바이러스 바이러스를 가진 것으로 추측된 살아있거나 죽은 개체(인간 또는 동물)로부터의 샘플)이다. 다른 실시양태에서, 샘플은 환경(하수오물)일 수 있다.

[0082] 샘플은 잘-공지된 단리 및 정제 프로토콜에 적용시키거나 직접 사용할 수 있다. 예를 들면, 샘플을 샘플의 핵산을 방출/추출하고/하거나 통상의 기술을 사용하여 샘플의 단백질 및 다른 비-핵산 구성성분을 제거하기 위한 처리에 적용시킬 수 있다.

[0083] HCirV-1 게놈 DNA의 증폭은 2개의 프라이머, 즉 "전방" 및 "역방" 프라이머로 수행할 수 있고, 이들 둘 다는 HCirV-1에 대해 특이적이다.

[0084] HCirV-1의 RNA의 역 전사는 HCirV-1에 대해 특이적인 "역 프라이머"를 사용하여 수행할 수 있다. "역 프라이머"는 이의 5'-3' 배향을 기반으로 하여, 단일-가닥 RNA에 결합하여 RNA의 상보성 DNA(cDNA) 카피의 생성을 개시하기 위해 제공될 수 있는 것이다. 역 전사는 잘 공지되고 통상의 방법으로 달성할 수 있다. 역 전사를 위한 반응 혼합물은 반응을 위한 시약, 예를 들면, 역 프라이머, dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP), 완충제, 및 역 전사효소를 포함한다. 예시적인 반응 조건은 실시예에 제시된다.

[0085] 역 전사에 의해 생성된 HCirV-1의 cDNA 카피의 증폭은 HCirV-1에 대해 특이적인 "전방 프라이머"를 사용하여 수행할 수 있다. "전방 프라이머"는 이의 5'-3' 배향을 기반으로 하여, 역 전사에 의해 생성된 RNA의 단일-가닥 안티센스 cDNA 카피에 결합하여 RNA의 이중-가닥 DNA 카피의 생성을 개시하기 위해 제공될 수 있는 것이다. 증폭은 잘 공지된 및 통상의 방법으로 달성할 수 있다. 증폭을 위한 시약 혼합물은 반응을 위한 시약, 예를 들면, 전방 프라이머, 역방 프라이머, dNTP, 완충제, 및 DNA 폴리머라제를 함유한다.

[0086] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법은 역 전사 및 증폭 반응을 위한 시약을 함유하는 단일의 RT-PCR 시약 혼합물을 사용하여 수행된다. 바람직하게는, 역 전사 반응에 사용된 역 프라이머를 또한 증폭 반응에 사용한다.

[0087] 바람직하게는, 역 전사 및 증폭 반응은 플라스틱 또는 유리 용기, 가장 바람직하게는 동일한 용기에서 수행된다.

[0088] 당해 분야에 공지된 증폭 방법은 RCA, MDA, NASBA, TMA, SDA, LCR, b-DNA, PCR(RT-PCR을 포함하는 모든 형태), RAM, LAMP, ICAN, SPIA, QB-레플리카제, 또는 Invader를 포함한다. 바람직한 증폭 방법은 폴리머라제 쇄 반응(PCR) 증폭이다. 참고: 예컨대, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (Ed. H. A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Eds. Iinis, et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19, 4967 (1991); Eckert et al., PCR Methods and Applications 1, 17 (1991); PCR (Eds. McPherson et al., IRL Press, Oxford); 및 U.S. Pat. Nos. 4,683,202, 4,683,195, 4,800,159 4,965,188, 및 5,333,675. 보다 바람직한 PCR 방법은 실시간 PCR, PCR-HRM(고-분해 DNA 용융(High-Resolution DNA Melting))(참고: Andriantsoanirina et al. Journal of Microbiological Methods, 78 : 165 (2009)) 및 형광성 미세구(Luminex ® 미세구)를 기반으로 리가제 검출 반응에 커플링된(coupled) PCR이다.

[0089] 증폭 기술은 특히 등온 방법 및 PCR-기반 기술을 포함한다. 등온 기술은 핵산-기반 증폭(NASBA), 루프-매개된 등온 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP), 헬리카제-의존성 증폭(helicase-dependent amplification; HDA), 롤링 환 증폭(rolling circle amplification; RCA), 및 가닥 대체 증폭(strand displacement amplification; SDA), 대수 증폭 반응(exponential amplification reaction; EXPAR), 핵산의 등

온 및 키메라 프라이머-개시된 증폭(isothermal and chimeric primer-initiated amplification of nucleic acid; ICAN), RNA 기술의 단일-매개된 증폭(signal-mediated amplification of RNA technology; SMART) 및 기타를 포함한다(참고: 예컨대, Asiello and Baeumner, Lab Chip; 11(8): 1420-1430, 2011).

[0090] 바람직하게는, PCR 기술은 DNA, cDNA, 또는 RNA의 출발 양을 정량적으로 측정한다. 본 발명에 따른 PCR-기반 기술의 예는 예를 들면, 정량적 PCR(Q-PCR), 역-전사효소 폴리머라제 쇄 반응(reverse-transcriptase polymerase chain reaction; RT-PCR), 정량적 역-전사효소 PCRT(quantitative reverse-transcriptase PCR; QRT-PCR), 또는 디지탈 PCR을 포함하나, 이에 제한되지 않는 것을 포함한다. 이러한 기술은 잘 공지되어 있고 당해 분야의 기술자에게 용이하게 이용가능한 기술이다. 바람직하게는, Q-PCR은 실시예에 제시된, 바람직하게는 본원의 실시예에 제시된 프라이머를 사용하여 수행된다.

[0091] 바람직하게는, 본 발명의 방법은 1-단계 실시간 RT-PCR 검정이다. 바람직하게는, 프로브는 증폭된 생성물을 검출하는 데 사용된다. 프로브는 형광성, 방사활성, 또는 효소 표지로 표지할 수 있다. 증폭된 생성물은 특정 검출 화학, 예를 들면, 형광성 공명 에너지 전달(fluorescence resonance energy transfer; FRET) 프로브, TAQMAN 프로브, 분자 비콘(molecular beacon), 스코르피온 프로브(scorpion probe), 형광성 표지된(또는 다른 표지된) 프라이머, 라이트텁 프로브(lightup probe) 또는 염료-기반 화학, DNA, PNA, LNA, 또는 목적한 서열을 검출하기 위해 증폭된 생성물에 결합하는 변형된 염기를 포함하는 RNA로 표지될 수 있다.

[0092] 증폭된 생성물의 검출은 실시간(증폭 공정 동안) 또는 종점(증폭 공정 후)일 수 있다. 본 발명은 증폭이 일어나는 동일한 베셀(vessel)에서 증폭 생성물의 검출을 허용한다.

[0093] 바람직하게는, DNA 내부 대조군을 사용하여 증폭 반응을 모니터링한다.

[0094] 바람직하게는, RNA 내부 대조군을 사용하여 역 전사 및 증폭 반응을 모니터링한다.

[0095] 본 발명의 프라이머는 HCirV-1 RNA의 역 전사 및 HCirV-1DNA의 증폭 둘 다에 유용하다. 프라이머 서열은 바람직하게는 HCirV-1에 대해 선택적이다. 본 발명은 프라이머의 세트, 즉, 상이한 배향의 적어도 2개의 프라이머를 포함한다. 바람직하게는, 프라이머는 하나의 전방 프라이머 및 하나의 역방 프라이머의 세트로 존재한다. 본원에 지칭된 프라이머 모두는 이러한 프라이머의 세트에 구체적으로 포함될 수 있다.

[0096] "역방 프라이머"는 안티-센스(anti-sense) 프라이머이고, 이는 역 전사용 프라이머일 수 있고, 바람직하게는 비-인간 시르코바이러스에 결합하지 않으나, HCirV-1에 대해 특이적이다.

[0097] 하나의 실시양태에서, HCirV-1의 RNA 서열은 바람직하게는 세포에서, 예를 들면, ISH에 의해 검출할 수 있다. 하나의 실시양태에서, bDNA 프로브의 칵테일(cocktail)을 설계하여 예를 들면, 실시예에 제시된 바와 같이, HCirV-1의 캡시드 및/또는 Rep 유전자를 표적화할 수 있다. 하나의 실시양태에서, ViewRNA ISH 조직 검정 키트 2-플렉스(Thermo Fisher Scientific)를 사용할 수 있다.

[0098] 바람직한 DNA 프로브는 예컨대:

[0099] HCirV-Pb : 5'-[FAM]GGAGATTGGAGAGAGTGGCTG[BHQ1]-3' ([FAM]- 서열 번호:15-[BHQ]) 이다.

[0100] 단백질 및 펩타이드

[0101] 본 발명은 HCirV-1 아미노산 서열을 기반으로 하는 단백질 및 펩타이드를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 단백질 또는 펩타이드는 HCirV-1 캡시드 또는 레플리카제 단백질 또는 펩타이드이다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 단백질 또는 펩타이드는 서열 번호: 2(캡시드 단백질) 또는 서열 번호: 12(레플리카제 단백질)의 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 10, 125, 150, 175, 200, 225 또는 250개의 아미노산을 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

[0102] 일부 실시양태에서, 본 발명의 단백질 또는 펩타이드는 서열 서열 번호: 2 또는 서열 번호: 12 중 어느 것의 모든 또는 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 10, 125, 150, 175, 200, 225 또는 250개의 아미노산을 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

[0103] 일부 실시양태에서, 본 발명의 단백질 또는 펩타이드는 서열 번호: 2 또는 서열 번호: 12와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 이의 변이체이다.

[0104] 바람직한 실시양태에서, 다음의 캡시드 단백질 단편은 혈청학적 수단에 의해 바이러스의 존재를 검출하는 데 사용될 수 있다:

[0105] NNGTVVQKFCKTEPFTLQNQDSTNAKKWMQGSYTTTLSEWVSSPGWDFYKILKLKLTFLPFNATQRMNYWPIGNTIIDLDGPWNEPNTVQSNLLCNTATSRL WKANRKHSRYFTPRPLIHLTGNTTSSQASALLPRRTWWNSAESTVKWGGLKYSHYVEYNQPVRYWLIKSAWIKWKYLL (서열 번호:16)

[0106] NNASIVQKFCKWEPISFQNTTNQNKWYIGSYTTNLKEWVTQPNWDLYKILKMKISFLPFTPTQKMPYWPIGNTIIDLDGPWPQPYTANSNLFCNTATSRSWY GNKKHSRYFTPRAVVNLTTTATTGEGTALLPRSTWWNCNNDSIIWGGLRFAHYIENGSNMAIRYHLQKSVWIKWKYLL (서열 번호:17)

[0107] 후자 서열은 2023년 5월 5일자로 발표된 리(Li) 등의 팀에 의해 제2의 환자, YN09/J030으로부터 수득된 인간 시르코바이러스의 캡시드 단백질의 단편에 상응한다(Li et al, *Emerging Infectious Diseases*, vol.29).

[0108] 일부 실시양태에서, 본 발명의 단백질 또는 펩타이드는 서열 서열 번호: 16 또는 서열 번호: 17 중 어느 것의 모든 또는 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 10, 125, 150, 또는 175개의 아미노산을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 이러한 펩타이드는 또한 본원에 본 발명의 "단편"으로 불린다.

[0109] 바람직하게는, 본 발명의 단백질 또는 펩타이드는 표지되어 있다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 단백질 또는 펩타이드 또는 단편은 가시화 분자(visualizing molecule), 예를 들면, 방사활성 원자, 염료, 형광성 분자, 형광단, 효소, 콜로이드성 금, 자기 입자, 또는 라텍스 비드(latex bead)로 표지된다.

[0110] 본 발명은 진단 검정에서 사용하기 위한 본 발명의 단백질 및 펩타이드, 및 이러한 검정에서의 이의 용도를 포함한다.

[0111] 항체

[0112] 본 발명은 상술한 바와 같은 HCirV-1 단백질 서열에 대해 생성된 항체를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 항체는 서열 번호: 2 또는 서열 번호: 12 또는 서열 번호: 16/17의 단백질에 결합한다. 바람직하게는, 항체는 임의의 다른 시르코바이러스 유사 울브펙 시르코바이러스(Genbank QSX73454, 서열 번호: 3)의 캡시드 단백질 또는 돼지 시르코바이러스 3의 캡시드 단백질에 결합하지 않는다.

[0113] 본 발명은 진단 검정에서 사용하기 위한 본 발명의 항체 및 이러한 검정에서의 이의 용도를 포함한다.

[0114] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 폴리클로날(polyclonal) 또는 모노클로날 항체는 토끼 또는 마우스에서 생성된다.

[0115] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 VHH 항체는 예를 들면, 알파카에서 생성된다.

[0116] 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 HCirV-1 단백질 또는 펩타이드 또는 단편(상기 기술된 바와 같은 서열 번호: 2, 12, 16, 17 또는 이의 임의의 변이체 또는 단편)에 대해 지시된 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 또는 이의 단편을 포함한다.

[0117] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 동물을 HCirV-1 단백질로 면역화(immunization)시켜 수득할 수 있다.

[0118] 본 발명의 항체는 면역검정에서 환자의 천연 HCirV-1 단백질에 결합하기 위한 시약으로서 제공될 수 있다.

[0119] 본 발명의 항체는 환자의 면역검정에서 단리된 및 정제된 HCirV-1 단백질에 결합하는 양성 대조군 시약으로서 제공될 수 있다.

[0120] 본 발명의 발명은 HCirV-1 단백질에 대해 지시된 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 및 이의 단편(예컨대, Fab, Fv, scFv)를 포함한다.

[0121] 본 발명의 목적을 위해, 발현 키메라 항체는 특수한 동물 종 또는 항체의 특수한 부류의 항체와 관련하여, 다른 동물 종의 항체 또는 항체의 다른 부류의 중쇄 및/또는 경쇄 모두 또는 일부를 포함하는 항체를 의미하는 것으로 이해된다.

[0122] 일부 실시양태에서, 정제된 단백질은 통상의 기술에 의해 항체를 생산하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 재조합 또는 합성 단백질 또는 펩타이드는 통상의 기술에 의해 항체를 생산하는 데 사용된다.

[0123] 항체는 합성, 반-합성, 모노클로날, 또는 폴리클로날일 수 있고 당해 분야에 잘 공지된 기술에 의해 제조할 수 있다. 이러한 항체는 항체의 항원-결합 부위(비-특이적인 결합과 대치되는 것으로서)를 통해 단백질 및 폴리펩타이드에 특이적으로 결합한다. 정제된 또는 합성 단백질 및 펩타이드는 이와 면역반응성인 항체를 생산하는 데 있어서 면역원으로서 사용될 수 있다. 단백질 및 펩타이드는 항체의 형성을 유발하는 항원 결정인자 또는 에피토프(epitope)를 함유한다.

[0124] 이러한 항원 결정인자 또는 에피토프는 선형 또는 구조적(불연속)일 수 있다. 선형 에피토프는 폴리펩타이드의 아미노산의 단일 구획으로 구성되지만, 구조적 또는 불연속 에피토프는 단백질 폴딩시 매우 근접할 수 있는 폴리펩타이드 쇄의 상이한 영역으로부터의 아미노산 구획으로 구성된다(C. A. Janeway, Jr. and P. Travers, Immuno Biology 3:9 (Garland Publishing Inc., 2nd ed. 1996)). 폴딩된(folded) 단백질은 복잡한 표면을 가지므로, 이용가능한 에피토프의 수는 매우 많지만; 단백질의 구조 및 입체적 장애로 인하여, 에피토프에 실제적으로 결합하는 항체의 수는 이용가능한 에피토프의 수 미만이다(C. A. Janeway, Jr. and P. Travers, Immuno Biology 2:14 (Garland Publishing Inc., 2nd ed. 1996)). 에피토프는 당해 분야에 공지된 어떠한 방법에 의해서도 확인할 수 있다. 이러한 에피토프 또는 이의 변이체는 당해 분야에 잘 공지된 기술, 예를 들면, 고체-상 합성, 폴리펩타이드의 화학적 또는 효소적 절단을 사용하거나, 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 생산할 수 있다.

[0125] 항체는 단백질 또는 폴리펩타이드에 약 10^{7} M^{-1} 이상의 Ka로 단백질 또는 폴리펩타이드에 결합하는 경우 특이적으로 결합하는 것으로 정의된다. 결합 파트너 또는 항체의 친화성은 통상의 기술, 예를 들면, 문헌: Scatchard et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949)에 기술된 것을 사용하여 용이하게 결정할 수 있다.

[0126] 폴리클로날 항체는 다양한 공급원, 예를 들면, 말, 소, 염소, 양, 개, 닭, 알파카, 낙타, 토끼, 마우스, 또는 래트로부터, 당해 분야에 잘 공지된 과정을 사용하여 용이하게 생성시킬 수 있다. 일반적으로, 적절하게 접합된 정제된 단백질 또는 폴리펩타이드는 전형적으로 비경구 주사를 통해 숙주 동물에게 투여된다. 면역원성은 보조제(adjuvant), 예를 들면, 프루언드 완전 또는 불완전 보조제(Freund's complete or incomplete adjuvant)를 사용하여 향상시킬 수 있다. 부스트 면역화(booster immunization) 후, 혈청의 작은 샘플을 수집하고 단백질 또는 폴리펩타이드에 대한 반응성에 대해 시험한다. 이러한 결정에 유용한 다양한 검정의 예는 문헌: Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988에 기술된 것 뿐만 아니라; 역류 면역-전기영동(countercurrent immuno-electrophoresis; CIEP), 방사면역검정, 방사-면역침전, 효소-결합된 면역흡착 검정(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA), 도트 블롯 검정(dot blot assay), 및 샌드위치 검정(sandwich assay)과 같은 과정도 포함한다. 미국 특허 제4,376,110호 및 제4,486,530호를 참고한다.

[0127] 모노클로날 항체는 잘 공지된 과정을 사용하여 용이하게 제조할 수 있다. 참고: 예컨대, U.S. Pat. Nos. RE 32,011, 4,902,614, 4,543,439, 및 4,411,993 에 기술된 과정; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKeam, and Bechtol (eds.), 1980.

[0128] 예를 들면, 마우스와 같은 숙주 동물에게 단리된 및 정제된 단백질 또는 접합된 폴리펩타이드, 예를 들면, 상기 제시된 특정 아미노산을 포함하거나 또는 이로 이루어진 펩타이드로 약 3주 간격으로 적어도 1회 및 바람직하게는 적어도 2회 복강내 주사할 수 있다. 이후에, 마우스 혈청을 통상의 도트 블롯 기술 또는 항체 캡쳐(antibody capture; ABC)로 검정하여 어느 동물이 가장 잘 융합되는지를 결정할 수 있다. 대략 2 내지 3주 후에, 마우스에게 단백질 또는 폴리펩타이드의 정맥내 부스트(intravenous boost)를 제공한다. 마우스를 후에 희생시키고, 비장 세포를 Ag8.653(ATCC)와 같은 상업적으로 이용가능한 골수종 세포와, 확립된 프로토콜에 따라 융합시킨다. 요약하면, 골수종 세포를 배지로 수회 세척하고 마우스 비장 세포에 약 3개이 비장 세포 대 1개의 골수종 세포의 비로 융합시킨다. 융합제는 당해 분야에 사용된 임의의 적합한 제제, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)일 수 있다. 융합물을 융합된 세포의 선택적인 성장을 허용하는 배지를 함유하는 플레이트에 플레이팅(plating)한다. 이후에, 융합된 세포를 대략 8일 동안 성장하도록 한다. 수득되는 하이브리도마로부터의 상층액을 수집하고 염소 항-마우스 Ig로 먼저 코팅된 플레이트에 가한다. 세척 후, 표지된 단백질 또는 폴리펩타이드와 같은 표지를 각각의 웰에 가한 후 항온처리한다. 양성 웰을 후속적으로 검출할 수 있다. 양성 클론을 대량 배양으로 성장시키고 상층액을 후속적으로 단백질 A 컬럼(Pharmacia) 위에서 정제한다.

[0129] 본 발명의 모노클로날 항체는 대안적인 기술, 예를 들면, 본원에 참고로 포함된 문헌: Alting-Mees et al., "Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas", Strategies in Molecular Biology 3:1-9 (1990)에 기술된 것을 사용하여 생산할 수 있다. 유사하게, 결합 파트너를 재조합 DNA 기술을 사용하여 작제함으로써 특이적인 결합 항체를 암호화하는 유전자의 가변 영역을 혼입시킬 수 있다. 이러한 기술은 문헌: Larrick et al., Biotechnology, 7:394 (1989)에 기술되어 있다.

[0130] 통상의 기술에 의해 생산될 수 있는, 이러한 항체의 항원-결합 단편이 또한 본 발명에 포함된다. 이러한 단편의 예는 Fab 및 F(ab')2 단편을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 유전 가공 기술에 의해 생산된 항체 단편 및 유도체가 또한 제공된다.

[0131] 본 발명의 모노클로날 항체는 키메라 항체, 예컨대, 쥐 모노클로날 항체의 인간화된 버젼을 포함한다. 이러한 인간화된 항체는 공지된 기술에 의해 제조되어, 항체가 인간에게 투여될 때 감소된 면역원성의 장점을 부여할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 인간화된 모노클로날 항체는 뮤린 항체의 가변 영역(또는 바로 이의 항원 결합 부위) 및 인간 항체로부터 유래된 불변 영역을 포함한다. 대안적으로, 인간화된 항체 단편은 뮤린 모노클로날 항체의 항원 결합 부위 및 인간 항체로부터 유래된 가변 영역 단편(항원-결합 부위를 결여함)을 포함할 수 있다. 키메라 및 추가로 가공된 모노클로날 항체를 생산하기 위한 과정은 문헌: Riechmann et al. (Nature 332:323, 1988), Liu et al. (PNAS 84:3439, 1987), Larrick et al. (Bio/Technology 7:934, 1989), 및 Winter and Harris (TIPS 14:139, May, 1993)에 기술된 것을 포함한다. 항체를 유전자이식으로 생성하는 과정은 제GB 2,272,440호, 미국 특허 제5,569,825호 및 제5,545,806호에서 찾을 수 있다.

[0132] 유전 가공 방법, 예를 들면, 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있는, 인간 및 비-인간 부위 둘 다를 포함하는, 키메라 및 인간화된 모노클로날 항체에 의해 생산된 항체를 사용할 수 있다. 이러한 키메라 및 인간화된 모노클로날 항체는 당해 분야에 공지된 표준 DNA 기술, 예를 들면, Robinson et al. 국제 공개 No. WO 87/02671; Akira, et al. 유럽 특허 출원 0184187; Taniguchi, M., 유럽 특허 출원 0171496; Morrison et al. 유럽 특허 출원 0173494; Neuberger et al. PCT 국제 공개 No. WO 86/01533; Cabilly et al. U.S. Pat. No. 4,816,567; Cabilly et al. 유럽 특허 출원 0125023; Better et al., Science 240:1041 1043, 1988; Liu et al., PNAS 84:3439 3443, 1987; Liu et al., J. Immunol. 139:3521 3526, 1987; Sun et al. PNAS 84:214 218, 1987; Nishimura et al., Canc. Res. 47:999 1005, 1987; Wood et al., Nature 314:446 449, 1985; and Shaw et al., J. Natl. Cancer Inst. 80:1553 1559, 1988); Morrison, S. L., Science 229:1202 1207, 1985; Oi et al., BioTechniques 4:214, 1986; Winter U.S. Pat. No. 5,225,539; Jones et al., Nature 321:552 525, 1986; Verhoeyan et al., Science 239:1534, 1988; and Beidler et al., J. Immunol. 141:4053 4060, 1988 에 기술된 방법을 사용한 유전 가공에 의해 생산할 수 있다.

[0133] 합성 및 반-합성 항체와 관련하여, 이러한 용어는 항체 단편, 동형 스위치된 항체(isotype switched antibody), 인간화된 항체(예컨대, 마우스-인간, 인간-마우스), 하이브리드, 다수 특이성을 갖는 항체, 및 충분한 합성의 항체-유사 분자를 포함하는 것으로 의도되나 이에 제한되지 않는다.

[0134] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 NANOBODIES로 또한 알려진 단일-도메인 항체(single-domain antibody; sdAb)를 포함한다. sdAb는 특정 항원에 선택적으로 결합할 수 있는 단일의 단량체성 가변 항체 도메인으로 이루어진 단편이다.

[0135] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 sdAb는 낙타과(camelid)(VHH 단편), 또는 연골어류(VNAR 단편)에서 발견된 중쇄 항체로부터 유래되거나, 또는 이량체성 가변 도메인을 단량체로 분할하여 수득된다.

[0136] 혈청학적 및 바이러스학적 진단

[0137] 본원에 기술된 바와 같은, HCirV-1 단백질 및 이러한 단백질로부터 유래된 펩타이드 및 이들에 대해 생성된 항체는 특히 면역검정, 예를 들면, 면역효소 방법(예컨대, ELISA)에 의해 인간 시르코바이러스 감염의 검출 및 진단(혈청학적 진단(특이적인 항체의 검출) 또는 바이러스학적 진단(바이러스 단백질의 검출)을 위해, 사용될 수 있다.

[0138] 본 발명은 환자로부터의 혈청 샘플을 제공하는 단계, 혈청을 HCirV-1 단백질과 접촉시키는 단계, 및 항원-항체 복합체를 가시화시키는 단계를 포함하여, 시르코바이러스로 감염된 환자를 확인하는 방법을 포함한다. 바람직하게는, 항원-항체 복합체는 EIA, ELISA, RIA, 또는 면역형광성에 의해 가시화된다.

[0139] 본 발명은 HCirV-1 단백질을 포함하는 조성물 또는 시르코바이러스에 대한 항체의 검출을 위한 HCirV-1 단백질의 용도 및 생물학적 샘플에서 시르코바이러스 감염의 진단을 포함한다.

[0140] HCirV-1 단백질 및 유래된 펩타이드에 대해 지시된 본 발명에 따른 항체 및 항체 단편은 시르코바이러스 감염의 직접적인 검출 및 진단 및 생물학적 샘플에서 HCirV-1의 검출에 유용하다. HCirV-1의 캡시드 또는 레플리카제 단백질의 검출은 감염될 경향이 있는 개체로부터 수집한 생물학적 샘플에서, 적절한 기술, 특히 EIA, ELISA, RIA, 면역형광성에 의해 수행된다.

[0141] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 생물학적 샘플에서 인간 시르코바이러스의 검출을 위한 방법을 포함하고, 이러한 방법은 이것이 시르코바이러스로 감염된 환자로부터의 생물학적 샘플을 항-HCirV-1 항체와 접촉시키는 단계, 및 형성된 항원-항체 복합체를 가시화하는 단계를 포함함을 특징으로 한다. 바람직하게는, 항원-항체 복합체는

EIA, ELISA, RIA, 또는 면역형광성에 의해 가시화된다.

[0142] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 HCirV-1 단백질은 적절한 지지체(support), 특히 미세플레이트 또는 비드에 부착된다.

[0143] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법은 시르코바이러스로 감염된 대상체, 바람직하게는 인간으로부터의 생물학적 샘플을 적절한 지지체, 특히 미세플레이트 또는 비드에 부착된, HCirV-1 단백질와 접촉시켜 결합이 일어나도록 하는 단계; 지지체를 세척하여 결합하지 않은 항체를 제거하는 단계; HCirV-1 단백질에 결합된 면역글로불린에 결합하는 검출 시약을 가하는 단계; 및 형성된 HCirV-1 단백질-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함한다.

[0144] 하나의 실시양태에서, 생물학적 샘플에서 시르코바이러스에 대한 항체를 검출하기 위한 본 발명의 방법은 HCirV-1 단백질을 제공하는 단계; 시르코바이러스로 감염된 환자로부터의 생물학적 샘플을 제공하는 단계; 상기 HCirV-1 단백질을 상기 생물학적 샘플과 접촉시키는 단계; 및 형성된 항원-항체 복합체를 가시화하는 단계를 포함한다.

[0145] 바람직하게는, 단백질-항체 복합체는 인간 면역글로불린에 결합하는 항체 또는 항체 단편으로 검출된다.

[0146] 바람직하게는, 검출 시약은 화학발광성 표지, 효소 표지, 형광성 표지, 및 방사활성(예컨대, 요오드) 표지로부터 선택된 표지를 포함한다. 가장 바람직하게는, 검출 시약은 인간 면역글로불린에 결합하는 표지된 항ㅊ 또는 항체 단편이다.

[0147] 바람직한 표지는 형광성 표지, 예를 들면, FITC, 화학단 표지, 친화성-리간드 표지, 효소 표지, 예를 들면, 알칼린 포스파타제, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 루시퍼라제 또는 갈락토시다제, 효소 보조인자 표지, 합텐 접합체 표지, 예를 들면, 디곡시게닌 또는 디니트로페닐, 라만 신호 생성 표지(Raman signal generating label), 자기 표지, 스핀 표지, 에피토프 표지, 예를 들면, FLAG 또는 HA 에피토프, 발광성 표지, 중 원자 표지(heavy atom label), 나노입자 표지, 전기화학 표지, 광 분산 표지, 구체 쉘 표지(spherical shell label), 반도체 나노결정 표지를 포함하고, 여기서 표지는 제2 검출 분자를 사용하거나 사용하지 않은 가시화를 허용할 수 있다.

[0148] 바람직한 표지는 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 루시퍼라제 또는 아세틸콜린에스테라제와 같은 적합한 효소; 스트렙타비진/바이오틴, 아비딘/바이오틴 또는 예를 들면, 토끼 IgG 및 항-토끼 IgG를 포함하는 항원/항체 복합체를 형성할 수 있는 결합 쌍의 구성원; 형광단, 예를 들면, 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 테트라메틸 로다민, 에오신, 녹색 형광성 단백질, 에리트로신, 코우마린, 메틸 코우마린, 피렌, 말라키트 그린(malachite green), 스틸벤, 루시퍼 옐로우(lucifer yellow), 캐스케이드 블루(Cascade Blue), 텍사스 레드(Texas Red), 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드, 피코에리트린, 형광성 란타나이드 복합체, 예를 들면, 유로퓸 및 테르븀을 포함하는 것, 시안 염료 계열 구성원, 예를 들면, Cy3 및 Cy5, 분자 비콘(molecular beacon) 및 이의 형광성 유도체 뿐만 아니라 당해 분야에 공지된 다른 것; 발광성 물질, 예를 들면, 루미놀; 광 산란 또는 플라스몬 공명 물질, 예를 들면, 금 또는 은 입자 또는 퀀텀 도트(quantum dot)를 포함하거나; 또는 방사활성 물질은 ^{14}C, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{32}P, ^{33}P, ^{35}S, 또는 ^{3}H를 포함한다.

[0149] 하나의 실시양태에서, 인간 면역글로불린에 결합하는 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 IgG, IgA, 및 IgM에 특이적으로 결합한다. 하나의 실시양태에서, 인간 면역글로불린에 결합하는 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 IgG, IgA, 또는 IgM에 특이적으로 결합한다.

[0150] 용어 "항체"는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 이의 단편, 예를 들면, F(ab')2 및 Fab 단편, 단일-쇄 가변 단편(scFv), 단일-도메인 항체 단편(VHH 또는 나노바디), 2가 항체 단편(디아보디(diabody)) 뿐만 아니라, 임의의 재조합적으로 및 합성적으로 생산된 결합 파트너도 포함함을 의미한다.

[0151] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 VHH, 바람직하게는 알파카 혈청이다.

[0152] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법은 환자 혈청을 사용하여 수득된 결과를 양성 및 음성 대조군과 비교하는 단계를 포함한다.

[0153] 양성 대조군은:

[0154] - 상기 기술된 바와 같은 HCirV-1 단백질로 면역화된 동물(예컨대, 토끼, 알파카 등)로부터의 혈청,

[0155] - 바람직하게는 서열 번호: 2를 포함하는, 상기 기술된 바와 같은 HCirV-1 단백질을 포함할 수 있다.

[0156] 본 발명의 방법은 다른 종의 시르코바이러스와 교차-반응하지 않는 신규한 시르코바이러스를 검출하기 위한 HCirV-1 단백질의 용도를 포함할 수 있다.

[0157] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법은 면역포획 방법을 포함한다.

[0158] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법은 HCirV-1 단백질에 대해 지시된, 제1의 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 또는 이의 단편(포획 항체)를 부착시키는 단계, 항체를 HCirV-1 단백질을 함유하는 생물학적 샘플과 함께 항온처리하는 단계, 및 형성된 항원-항체 복합체를 바람직하게는 모노클로날 항체(가시화 항체)를 사용하여 검출하는 단계를 포함한다.

[0159] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법에 사용된 생물학적 샘플은 이를 포획 항체와 접촉시키기 전에 가시하 모노클로날 항체와 혼합시킨다.

[0160] 본 발명에 따른 면역포획 시험에서, HCirV-1 단백질을 사용한 가시화를 위해 가시화 분자 또는 입자와 함께 접합된 모노클로날 항체를 사용하는 것이 가능하다.

[0161] 가시화 분자는 방사활성 원자, 염료, 형광성 분자, 형광단, 효소일 수 있고; 가시화 입자는 예를 들면, 콜로이드성 금, 자기 입자 또는 라텍스 비드일 수 있다.

[0162] 본 발명의 대상은 상기 정의된 바와 같은 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 또는 항체 단편, 및 HCirV-1 단백질로 형성된 면역 복합체이다.

[0163] 항원 및 항체 검출 키트

[0164] 본 발명은 상기 기술된 바와 같은, HCirV-1 단백질, 및/또는 이에 대해 생성된 항체를 포함함을 특징으로 하는, 시르코바이러스 검출 키트를 포함한다.

[0165] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 HCirV-1 단백질은 상기 기술된 바와 같은 서열 번호: 2 또는 서열 번호: 12 또는 서열 번호: 16/17의 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0166] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 시르코바이러스 감염의 검출을 위한 키트를 포함하고, 이러한 키트는 항원-항체 복합체의 검출을 위한, 상기 기술된 바와 같은 HCirV-1 단백질 및 시약을 함유한다.

[0167] 바람직하게는, 본 발명의 키트는 HCirV-1 단백질로 면역화된 동물의 혈청을 함유한다.

[0168] 가장 바람직하게는, 본 발명의 혈청은 HCirV-1 단백질로 면역화된 동물로부터의 토끼 또는 알파카 혈청이다.

[0169] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키트는 본원에 기술된 바와 같은 서열 번호: 2, 또는 서열 번호: 12 또는 서열 번호: 16 또는 서열 번호: 17의 아미노산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하거나 또는 이로 이루어진 HCirV-1 단백질을 포함한다.

[0170] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키트는 HCirV-1 단백질 및 HCirV-1 면역 혈청 둘 다를 포함한다.

[0171] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 키트는 예비 스크리닝(screening) 시험 결과가 필요한 사용을 위해 설계된 단순한/신속한 시험(Simple/Rapid test)이다. 이러한 시험은 응집, 면역-도트, 면역-크로마토그래피 및/또는 면역-여과 기술을 기반으로 한 시험일 수 있다. 바람직하게는, 시험은 바람직하게는 약 10분 내지 약 2시간에 수행하기에 신속하고 용이하며, 추가의 장비를 약간 필요로 하거나 또는 필요로 하지 않는다.

[0172] 바람직하게는, 본 발명의 키트는 연장된 기간 동안 실온에서 저장할 수 있다.

[0173] 면역원성 조성물

[0174] 본 발명은 또한 예컨대, 서열 번호: 2, 서열 번호: 12, 서열 번호: 16 또는 서열 번호: 17의 본 발명에 따른 펩타이드 또는 단백질, 또는 이의 임의의 변이체/단편을 포함하는 면역원성 조성물 또는 백신 조성물에 관한 것이다.

[0175] 특수한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 보조제(adjuvant) 및/또는 약제학적으로 허용되는 비히클(vehicle)을 추가로 포함한다.

[0176] 본원에 정의된 바와 같이, 약제학적으로 허용되는 비히클은 조성물 내에 본 발명에 따른 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 벡터의 형성을 가능하게 하는 어떠한 물질도 포함한다. 비히클은 생리학적으로 허용되는, 즉, 숙주, 특히 인간과 접촉하는 조성물에서 이의 사용에 적합하고, 따라서 무독성인 임의의 물질 또는 물질의 조합이

다. 이러한 비히클의 예는 포스페이트 완충된 용액, 증류수, 오일/물 유제와 같은 유제, 다양한 유형의 습윤제 멸균 용액 등이다.

[0177] 본원에 정의된 바와 같이, 보조제는 예를 들면, 수성 상을 지닌 유액의 형태로 일반적으로 사용된, 리포좀, 오일상, 예를 들면, 프루언드 유형 보조제를 포함하거나 수-불용성 무기 염, 예를 들면, 수산화알루미늄, 인산아연, 콜로이드성 수산화철, 인산칼슘 또는 염화칼슘을 포함할 수 있다.

[0178] 다른 특수한 실시양태에서, 본 발명의 무기 조성물은 피하(s.c.), 피내(i.d.), 근육내(i.m.), 복강내(i.p.) 또는 정맥내(i.v.) 주사와 같은 비경구 경로를 통한 투여를 위해 제형화된다.

[0179] 다른 특수한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 단일 또는 다중 투여 용량(들), 특히 프라임-부스트 투여 요법으로 투여된다.

[0180] 투여될 양(투여량)은 치료된 대상체, 예를 들면, 환자의 상태, 개개 면역계의 상태, 투여 경로 및 숙주의 체격에 의존한다. 적합한 투여량은 바이러스 벡터의 경우 10^3 TCID50 내지 10^7 TCID50의 범위 또는 100 마이크로그램의 플라스미드 DNA이고, 환경에 따라, 당해 분야의 기술자에 의해 변형될 수 있다.

[0181] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 또는 백신 조성물은 인간 대상체에서 시르코바이러스 감염 및 관련된 질환, 특히 간염의 예방에 사용하기 위한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0182] 본 발명은 도면을 참조하여 더 상세히 이해될 것이다.

도 1은 가장 가까운 시르코바이러스 속 구성원(genus member)의 캡시드 유전자(capsid gene)의 계통학적 분석을 나타낸다.

도 2는 서열에서의 품질 점수(quality score)(Q 점수)를 나타낸다.

도 3은 마이크로시크(Microseek)를 사용하여 환자의 간 생검 서열분석(sequencing) 후 시르코비리다에(*Circoviridae*) 서열의 확인 및 확인된 가장 가까운 바이러스 서열을 나타낸다.

도 4는 임상 및 실험실 데이터를 나타낸다. 상부 패널은 시간에 따른 바이러스 부하(viral load)(HCirV-1, CMV, EBV, TTV), 간 세포분해 마커(ALAT, ASAT, GGT) 및 혈액 세포 수(림프구, 백혈구 세포 및 혈소판)의 모니터링을 나타낸다. 하기 패널은 환자의 치료 이력(history)을 요약한다.

도 5는 소엽성 간염(lobular hepatitis), 세포자멸사체(apoptotic body), 간세포 팽윤 및 벌루닝(ballooning)이 림프구 및 조직구로 이루어진 약간의 염증성 침윤물로 둘러싸여 존재함을 나타낸다(G 20X, HES).

도 6은 HCirV-1의 계통학적 분석을 나타낸다. HCirV- 1 및 대표적인 시르코바이러스 균주의 캡시드 단백질 서열의 계통학적 분석. 균주를 L-INS-I 매개변수 하에 MAFFT와 정렬시키고, 최대-가능성 계통학 재구성(maximum-likelihood phylogenetic reconstruction)을 NGPhylogeny 포털을 통해 구현된 PhyML을 사용하여 수행하였다. HCirV-1 캡시드 유전자는 적색으로 묘사한다.

도 7은 간 단면에서의 동일계 내(*in situ*) 하이브리드화를 나타낸다. 간세포 핵 및 세포질에서 HCirV-1 mRNA(적색으로 표지됨)의 색원체성 동일계 내 하이브리드화 검출. 핵은 해리스 헤마톡실린(Harris hematoxylin)(Gx40)으로 역염색(counterstaining)하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0183] **실시예**

[0184] 본 발명자는 알려지지 않은 병인의 세포용해성 간염을 앓고 있는 61세의 고형 장기 이식된 여성의 경우를 보고한다. 이 환자는 17년 전에 심실 중격 결손과 관련된 아이젠멘거 증후군(Eisenmenger syndrome)으로 인해 심폐 이식을 받았다. 유지 면역억제 요법은 타크롤리무스, 미코페놀레이트 모페틸 및 프레드니손을 포함하였다. 그녀는 급성 폐 이식편 기능 장애로 인해 간염이 발생하기 16개월 전에 펄스 스테로이드(pulse steroid)를 투여받았습니다. 환자는 내원하기 2년 반 전에 수술로 치료한 국소성 좌상엽 폐 선암종의 병력을 가졌다. 그녀는 또한 칼시뉴린 억제제(Cockcroft-gault to 23mL/min), 아스퍼길러스 종(*Aspergillus sp.*) 및 스케도스포리움 종(*Scedosporium sp.*) 기관지폐 감염, 파르보바이러스 B19 감염 및 COVID-19 감염으로 인한 만성 신부전의 병력을

가졌다.

[0185] 2021년 11월에, 환자는 포스카비르에 이어 마리바비르 치료 이후 레테르모비르 장기 유지 치료요법을 필요로 하는 내성 바이러스에 의한 CMV 대장염으로 입원하였다. 이때 초음파 검사에서 증상이나 간 이상이 없는 세포용해가 검출되었다(도 4).

[0186] 이러한 입원 4개월 후, 그녀의 간염은 악화되어 트랜스아미나제 혈청 수준이 정상 상한치의 40배까지 증가하였고(도 4). 이로 인해 재입원하였다. 환자는 최근 체중 감소를 제외하고는, 무증상이었고, 프로트롬빈 시간 수치가 정상이어서 생물학적 심각성이 없었다. A형, B형, C형, E형 간염, HIV, CMV, HSV, VZV, 인간 헤르페스 바이러스 6, 아데노바이러스, 엔테로바이러스(혈액 및 대변), 파보바이러스 B19, 톡소플라스마증, 매독 및 렙토스피라증을 포함한, 일반적인 감염은 배제되었다. EBV PCR만이 양성(104.4개의 유전체 사본/혈액 1mL)이었다. 간 효소의 진화와 환자의 다양한 의약 간의 타임라인 관계에 대한 증거는 없었다. 그녀는 파라세타몰, 알코올, 불법 약물 또는 식물치료요법을 사용하지 않았다고 보고하였다. 심장 초음파는 심부전을 나타내지 않았다. 심장 부정맥이 없었고, 간 초음파 및 도플러 검사, CT 스캔 및 담관 MRI에서 혈관 또는 담관 이상(abnormality)이 없었다. 자가면역 이상에 대한 시험은 음성이었다. 최종적으로, 세룰레오플라스미네미아(ceruleoplasminemia)는 정상이었다. 이후에, 간 생검을 수행하였다. 병리학적 실험은 소엽성 간염이 나타내었고, 약간의 염증이 있었고, 상피모양 과립종은 없었고, 유의적인 문맥 염증과 섬유증, 또는 림프증식이 있었다. Ziehl, EBV, CMV 및 아데노바이러스 염색은 음성이었다. 생검 샘플의 세균학적 실험(마이코박테리아 배양물 및 PCR, 광범위한 16S 리보솜 RNA 유전자 PCR 포함)는 음성이었다. HSV-1, -2, CMV, 아데노바이러스 및 엔테로바이러스 PCR은 음성이었고 EBV PCR은 양성(135 gc/g DNA, 사이클 임계값 = 35)이었지만 급성 간염에 기인하지 않았다. 전반적으로, 호산구 침윤, 혈관 또는 담관 손상 및 자가면역 간 질환(혈장세포 없음)의 결여와는 대조적으로 림프구 염증 패턴은 바이러스 간염을 강력히 시사하였다. 중심소엽괴사와 대식세포에 의한 흡수의 정도는 최근의 및 중요한 간 세포용해를 암시하였다. 이러한 제1-라인 음성 결과에 따라, 간 생검에 대한 mNGS를 수행하였고 새로운 시르코바이러스(HCirV-1)를 나타내었다. 간 조직, 대변, 기관지폐포 세척액, 소변 및 타액에 대한 qPCR에 의한 HCirV-1의 추가 탐색 및 정량화를 수행하였다(표 1). 환자의 과거 혈액 샘플에 대한 검토 및 검사를 또한 수행하였다(표 2).

[0187] [표 1] HCirV-1 검출 및 정량화를 위해 qPCR로 시험한 간 생검, 대변, 뇨, 타액 및 기관지 폐포 (BAL) 샘플

표 1

[0188]

샘플링 유형	샘플링 일자	qPCR Ct 값	Cp/mL (뇨, 타액, BAL) 또는 Cp/gram (생검, 대변)
대변	19/11/2021	23,5	3,12E+05
BAL	06/01/2022	24,8	3,24E+05
대변	27/01/2022	25,5	7,98E+04
간 생검	21/03/2022	16,4	3,57E+08
대변	01/04/2022	23,7	2,68E+05
대변	11/05/2022	28,6	1,06E+04
뇨	08/06/2022	26,4	1,13E+05
타액	08/06/2022	26,0	1,45E+05
대변	09/06/2022	27,2	2,60E+04

[0189] [표 2] HCirV-1의 검출 및 정량화를 위해 qPCR로 시험한 혈액, 혈장 및 혈청 샘플

표 2

[0190]

샘플유형	샘플링 일자	qPCR Ct 값	Cp/mL
혈청	11/10/2017	neg	neg
혈청	28/08/2019	neg	neg
혈청	12/06/2020	neg	neg
혈청	24/07/2020	neg	neg
혈청	23/09/2020	32,4	2,00E+03
혈장	17/09/2021	17,9	3,24E+07
혈청	05/11/2021	12,4	1,25E+09
혈청	18/11/2021	13,9	4,38E+08
혈청	30/11/2021	15,1	2,07E+08
혈청	10/12/2021	17,4	4,49E+07
혈청	05/01/2022	16,3	9,19E+07
혈청	12/01/2022	8,4	1,72E+10
혈청	25/01/2022	11,5	2,19E+09
혈장	10/03/2022	15,3	1,77E+08
혈청	14/03/2022	14,6	2,77E+08
혈장	16/03/2022	15,1	2,08E+08
혈청	18/03/2022	14,3	3,52E+08
혈액	04/04/2022	10,0	5,81E+09
혈청	05/05/2022	18,1	2,73E+07
혈청	05/05/2022	17,2	4,92E+07
혈장	08/06/2022	19,2	1,36E+07
혈액	08/06/2022	20,3	6,36E+06

[0191] 2022년 6월부터, 환자의 임상 상태는 현재 안정적이다. 본 발명자는 세포 용해가 개선된 것을 주목하고 있다. 최근 감염성 질환의 이러한 맥락에서, 면역 억제 치료는 미코페놀레이트 모페틸 중단으로 최소화하였다(도 4). 본 발명자는 HCirV-1의 가능한 감염원을 확인하려고 시도하였다. 환자는 조류 및 설치류와 접촉한 고양이 2마리 둘 다와의 접촉을 보고하였다. 진단 후 2개월째에 그녀의 고양이의 대변에서 HCirV-1 PCR은 음성이었다. 환자는 어떠한 해외 여행도 부인하였다. 그녀는 첫 번째 HCirV-1 검출 17개월 전에 발생한 수혈을 보고하였다(도 4).

[0192] 본 발명자는 심각한 간 세포용해 증상을 보이는 심장과 폐 이중-이식 수혜자의 간에서 바이러스 서열을 검색하여 새로운 시르코바이러스를 확인하였다.

[0193] 손상된 간 조직을 생검에서 수득하였고, 매우 깊은 서열분석(very deep sequencing)(High Throughput Sequencing, 또는 NGS)을 수행하였다.

[0194] 환자의 간 생검으로부터의 핵산을 geneLEAD VIII 기구(Diagenode)를 사용하여 추출하였고, 농도는 15ng/L로 되었다. 추출 후 RNA 무결성 수(RNA Integrity Number; RIN)는 2.9이었다. Metagenomics 차세대 서열분석 라이브러리 제조를 위해 2개의 프로토콜을 따랐다: (i) cDNA 라이브러리는 SMARTer 표준 총 RNA-Seq 키트 - Pico Input Mammalian(Takara Bio, kit v.3)으로 작제하였다. 이러한 과정은 총 RNA의 첫 번째 가닥 cDNA으로의 무작위 역전사, 인간 리보솜 cDNA를 고갈, 및 최종적인 PCR 증폭을 포함하였다; (ii) 제조업체의 설명서에 따라 SuperScript IV 제1-가닥 합성 시스템 키트(Invitrogen)를 사용하여 랜덤 프라이머로 cDNA 라이브러리를 작제한 다음, MALBAC 증폭(Yikon Genomics)을 수행하고 Illumina DNAPrep(Illumina, 이전에는 Nextera DNA Flex)의 투입(input)으로 사용하여 최종 NGS 라이브러리를 생성하였다.

[0195] RT/MALBAC/DNA Prep 라이브러리를 NextSeq500 기기(Illumina)에서 고처리 유동 셀(High Output flow cell)을 사용하여 1x151bp로 서열분석하여, 약 8000만 개의 원시 판독물을 생성하였다. 대부분의 원시 판독은 20 초과의

품질 점수(Q 점수)를 가졌다(도 2).

[0196] 농축-기반 서열분석으로부터의 원시 판독물을 품질 검사 및 트리밍(trimming), 판독 정규화, 드 노보 조립(*de novo* assembly), 콘티그(contig) 및 싱글톤(singleton)의 ORF 예측을 포함하는 사내 생물정보학 파이프라인(Microseek; Bigot et al., DOI: 10.3390/v14091990)으로 처리한 다음, 3단계의 분류 할당을 거쳤다. 연관된 분류 수준이 있는 수득되는 바이러스 히트(viral hit)는 크로나(Krona)로 표시하였다(도 3).

[0197] 이용 가능한 가장 긴 캡시드 콘티그(capsid contig)(k141_422_flag=1_multi=91.0000_len=931_742_41__46_234)는 아미노산 수준에서 확인된 가장 가까운 바이러스(볼브퐥 시르코바이러스 진뱅크 QSX73454)와 39%의 동일성을 갖는다. 시르코비리다에로 확인된 서열을 이후에 GENEIOUS PRIME 2022.1.1(Biomatters Ltd)을 사용하여 적절한 참조 서열 내로 맵핑하여 전체 게놈을 설명하였다(도 3). 시드(seed)로 사용된 가장 긴 캡시드 콘티그로부터, 반복적 맵핑 접근법을 사용하여 캡시드의 전체 서열을 재작제하였다. 재작제된 캡시드의 뉴클레오타이드 서열뿐만 아니라 아미노산 서열을 서열 번호: 1 및 서열 번호: 2에 나타낸다.

[0198] 시르코바이러스의 새로운 종을 확인하여 시르코비리다에 과의 시르고바이러스 속의 인간 시르코바이러스 1(HCirV-1)으로 명명하였다. 인간에서 이전에 알려진 병원성 시르코바이러스는 없었다.

[0199] 서열을 기반으로 하여, 계통수를 생성하여 도 1에 나타낸다. 캡시드 유전자의 계통학적 분석(blast.ncbi.nlm.nih.gov/)은 이 바이러스가 시르코바이러스 속 구성원 내의 새로운 계통분기에 상응함을 나타낸다.

[0200] 신규한 인간 시르코바이러스의 캡시드는 아래 기재된 가장 가까운 시르코바이러스인, 울브퐥 시르코바이러스, 진뱅크 QSX73454와 아미노산 수준에서 단지 39%의 동일성을 나타내었다: MRRYRRLRRR RRRRPRRPRY RRRIRRTWIR RPTAGTYYTK KYSTMNIINL GKRESTKYWKVGHYTTSLKE WGSKWIWDYY KILKMKITFY PQESNCFQHS LLWGHTVIDY DGSWSTEGWLQDDPYANSST GRVWMSNKKH SRYFTPKPFL VQTSSSYTGQ SLFYFTRNTP WLNCYDLDTKWGALLFSAYA PADDTTPLYV QKSVWIRFKT VL (서열 번호: 3).

[0201] 대조적으로, 동물에서 알려진 다수의 시르코바이러스(부리 및 깃털 질환 바이러스(BFDV), 돼지 시르코바이러스 1, 2, 3(PCV1-3)), 예를 들면, 간친화성 바이러스(말 시르코바이러스 1 균주)가 존재한다. Hui et al., 2021 (https://doi.org/10.3390/v13050944). HCirV-1의 캡시드 단백질의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 서열 번호: 1 및 서열 번호: 2에 나타낸다.

[0202] 간 생검에서 바이러스 서열의 수는 매우 많았고(>1000개의 콘티그(contig) 및 싱글톤(singleton)) NGS에 의해 다른 바이러스 또는 세균 서열은 발견되지 않았고, 이는 이러한 질환에서 HCirV-1의 역할을 뒷받침한다.

[0203] **대조군의 설명**

[0204] 본 발명자는 간염이 있거나 없는 면역저하된(immunocompromised) 또는 면역적격인(immunocompetent) 환자의 대변 및 혈액 샘플에서 대조군 HCirV-1 qPCR을 후향적으로 수행하였다(표 3). 또한 본 발명자는 본 발명자의 연구실에서 2019년부터 병원체 진단을 위해 간 생검에서 정기적으로 수행한 mNGS의 결과를 검토하였다(표 4).

[0205] [표 3] 특정 HCirV-1 qPCR로 수행한 36개의 혈액 및 20개의 대변 샘플에서 HCirV-1 존재의 평가를 위한 대조군 특성

표 3

대조군	간염[a] (n=16)	면역적격 w/o 간염 (n=12)	면역저하 w/o 간염 (n=28)	총 (n=56)
연령, 평균(범위), 년	17(3-53)	30(0.2-67)	44(1-84)	33(0.2-84)
성체 > 15세, n(%)	5(31)	7(58)	22(78)	35(63)
성별, 여성, n(%)	4(25)	7(58)	11(39)	22(39)
시험된 샘플, n(%)				
혈액	10(62)	8(66)	18(64)	36(64)
대변	6(38)	4(33)	10(36)	20(36)
면역학적 상태, n(%)				
면역 적격	5(31)	12(100)	0	17(30)
HIV 혈청양성	0	0	2(7)	2(4)
고형 기관 이식	1(6)	0	12(43)	13(23)
1차 면역 결핍성	10(63)	0	9(32)	19(34)
HSCT 또는 면역억제 치료	0	0	5(18)	5(9)

표 범례; a=간비대 및/또는 간 세포용해; w/o=~가 없는 (without) ; HSCT=간 조혈 줄기 세포 이식체 ic Stem

[0206]

[0207] [표 4] 메타게놈 차세대 서열분석으로 스크리닝한 57개의 간 생검 샘플에서 HCirV-1 존재의 평가를 위한 대조군 특성(Controls characteristics)

표 4

대조군	총 (n=57)
연령, 평균(범위), 년	13 (0.3-68)
성체 > 15세, n(%)	10(18)
성별, 여성, n(%)	20(35)
면역학적 상태, n(%)	
면역적격	5(9)
HIV 혈청 양성	2(4)
고형 기관 이식	5(9)
1차 면역 결핍	25(44)
HSCT 또는 면역억제 치료	20(35)

[0208]

[0209] **핵산 추출**

[0210] 환자의 간 생검으로부터의 핵산을 geneLEAD VIII 기구(Diagenode)를 사용하여 추출하였다. 200L의 혈장, 혈청, 전혈, 기관지폐포 세척액(BAL) 및 대변으로부터의 핵산을 Emag 기구(Biomérieux)를 사용하여 추출하였다.

[0211] **mNGS**

[0212] cDNA를 SuperScript IV 제1-가닥 합성 시스템 키트(First-Strand Synthesis System kit)(Invitrogen)를 사용하여 환자의 간 생검으로부터 생성하였다. MALBAC 증폭(Yikon Genomics)을 이전에 기술한 바와 같이 [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] Illumina DNAPrep(Illumina, 이전에는 Nextera DNA Flex)의 투입물로 사용하였다. 라이브러리를 NextSeq500 기기(Illumina)에서 1x151bp로 서열분석하여 약 8000만 개의 원시 판독물을 생성시켰다. 원시 판독물을 RVDB-프롯(prot) 참조 바이러스 데이터

베이스를 사용하여 사내 생물정보학 파이프라인으로 처리하였다(Bigot T, Temmam S, Pérot P, Eloit M. RVDB-prot, a reference viral protein database and its HMM profiles. F1000Res 2019; 8:530.

[0213] **qPCR HCirV-1**

[0214] 다음의 PCR 프라이머를 HCirV-1의 캡시드 유전자에서 설계하였다: HCirV1-Fw1: 5-ACCTGGATTGGACCCTGGAAT-3(서열 번호: 4); HCirV1-Rv1: 5-AGAGTTCCACCAGGTTCTGC-3(서열 번호: 5)(194bp). 정량적 PCR을 SYBR Green 포맷으로 58℃의 어닐링(annealing) 온도에서 45 주기의 증폭으로 수행하였다. 45 주기 후 양성 앰플리콘을 겔에서 정제하고, 생거 서열분석(Sanger sequencing)으로 확인하고 바이러스 부하를 계산하기 위한 표준 곡선을 생성하기 위해 연속-희석을 사용하였다.

[0215] **완전한 게놈의 획득**

[0216] HCirV-1의 전체 게놈을 phi29 폴리머라제(WTA, Qiagen)로 예비-증폭한 후, 2022년 1월 12일 환자의 혈장(1010개의 바이러스 카피/mL를 보유함)을 서열분석함으로써 수득하였다. Geneious Prime 2022.1.1(Biomatters Ltd)을 사용한 반복적 맵핑 접근 방식을 적용하여 최종 조립을 수행하였다. 완전한 게놈 서열을 수탁 번호 ON677309로 진뱅크에 기탁하였다.

[0217] 간 생검 NGS에서 새로운 시르코바이러스의 확인을 사용하여 간 생검 표본으로부터 바이러스 서열을 분석하였다. 캡시드 및 Rep 유전자에 상응하는, 시르코비리다애 계열의 총 1011개의 서열을 확인하였다. 바이러스혈증이 최고치일때 취한 혈장 샘플로부터, 본 발명자는 바이러스의 콘센서스(consensus) 전체-게놈 서열(2021 pb)을 유도하였고, 이를 본 발명자는 HCirV-1(진뱅크 ON677309)로 지칭하고 이 서열이 간에서 발견된 캡시드 유전자의 부분 서열과 동일함을 확인하였다. 본 발명자는 HCirV-1의 2개의 바이러스 단백질인, 캡시드 및 Rep와 대표적인 동물 시르코바이러스에 대한 계통발생학적 분석을 수행하였다. 2개의 분석은 일치하였고 HCirV-1은 가장 가까운 바이러스 종(울브퀙 시르코바이러스와 돼지 시르코바이러스 3)과 비교하여 기본 위치에서 새로운 계통분기를 정의함을 나타내었다.

[0218] **계통학**

[0219] 계통학적 재구성을 캡시드 단백질 서열, 레플리카제(Rep) 단백질 서열 및 HCirV-1의 완전한 뉴클레오타이드 서열에 대해 수행하였다. 캡시드 및 레플리카제 유전자의 완전한 ORF를 L-INS-i 매개변수 하에 MAFFT(신속한 포리어 형질전환을 사용한 다중 정렬(Multiple Alignment using Fast Fourier Transform)) 정렬기를 사용하여 시르코바이러스의 다른 대표적인 서열과 함께 정렬하였다. 최대-경향성 계통학적 재구성(maximum-likelihood phylogenetic reconstruction)을 NGPhylogeny 포털을 통해 구현된 PhyML로 수행하였다(Lemoine F, Correia D, Lefort V, et al. NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists. Nucleic Acids Research 2019; 47:W260-W265). 노달 지지(Nodal support)를 "대략적인 베이즈 분기 지지도(Approximate Bayes branch supports)"를 사용하여 평가하였다.

[0220] **TTV 및 EBV qPCR**

[0221] TTV DNA 부하를 이전에 기술된 바와 같이 TTV R-GENE® 키트(Biom_rieux, Marcy-l'Etoile, France)를 사용하여 수행되었습니다(Kulifaj D, Durgueil-Lariviere B, Meynier F, et al. 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 부하는 EBV R-GENE® 키트(Biomérieux, Marcy l'Etoile, 프랑스)를 사용하여 수행하였다. 실시간 PCR 증폭은 AB7500 플랫폼(Applied Biosystems, 미국 매사추세츠주 왈탐(Waltham))에서 수행하였다.

[0222] 본 발명자는 2017년 이후 이러한 사례로부터 취한 혈장과 다른 생물학적 샘플의 바이러스 부하의 변화를 평가하기 위해 정량적 PCR(qPCR)을 설계하고 수행하였다. 본 발명자는 또한 이식 수혜자의 면역 상태와 높은 수준의 바이러스 혈증이 잘 연관되어 있는 공생 바이러스(commensal virus)인 토크 테노 바이러스(torque teno virus; TTV) 부하를 평가하였다(Jaksch P, Görzer I, Puchhammer-Stöckl E, Bond G. Integrated Immunologic Monitoring in Solid Organ Transplantation: the Road Towards Torque Teno Virus-guided Immunosuppression. Transplantation 2022). TTV DNA 부하는 2017년부터 현재까지 0 내지 3.99 log cp/ml 사이에서 변하였다. 이는 낮은 수준의 면역 억제를 나타내며 [Redondo N, Navarro D, Aguado JM, Fernández-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 바이러스혈증 피크는 세포용해에서의 피크와 관련이 없었다. 대조적으로, 혈액에서 HCirV-1이 처음 발견된 것은 2020년 9월(103.3 gc/mL)일 수 있고, 이는 스테로이드 펄스 후 2개월째인 반면, 이전 샘플(2020년 7월)은 음성이었다. 그럼에도 불구하고, 2020년 9월의 HCirV-1의 낮은 수준은 의심스러운데, 이는 튜브가 109.1 gc/mL 이하를 보유한 다른 튜브와 동시에 열렸으므로, 교차-오염을 야기하였을 수 있기 때문이다. 다음으로 이용가능한 샘플은 2021년 9월에 취하였고 강력하게 양성(107.5 gc/mL)이었다. 따라서, 부하는 108.3 내지 1010.2 gc/mL 에서 변하였다. HCirV-1 부하는 뚜렷한 세포용해 기간 동안만 높았다.

[0223] **대조군에서 HCirV-1 존재의 평가**

[0224] HCirV-1 존재를 평가하기 위해 동일한 특이적인 qPCR 프라이머를 사용하여 시험한 대조군에서는 양성 샘플이 검출되지 않았다. 56명의 환자로부터 총 36개의 혈액 샘플과 20개의 대변 샘플을 시험하였다(표 3). 이러한 환자들 중 19명(34%), 17명(30%), 13명(23%), 5명(9%), 2명(4%)은 각각 원시 면역저하된, 면역적격성인, 고형 장기 이식 수혜자, 조혈모 줄기 세포 이식 수혜자 또는 면역억제 치료를 받고 있고, HIV 양성이었다. 간 세포용해증이 있는 16명의 환자(표 3) 중 8명은 병인이 알려지지 않았다. 2019년 이후 mNGS에서 정기적으로 스크리닝된 대조군 생검은 간염이 있고 감염성 기원이 의심되는 57명의 환자에서 HCirV-1 서열을 나타내지 않았고 예측된 감염성 기원 25명(44%), 20명(35%), 5명(9%), 5명(9%), 2명(4%)은 각각 원시 면역저하된, 조혈 줄기세포 이식 수혜자이거나 면역억제 치료를 받은, 면역적격, 고형 장기 이식 수혜자 및 HIV 양성이었다(표 4). 여기서 본 발명자는 61세의 심장-폐 이식된 여성의 간 및 혈액에서 높은 부하량의 새로운 인간 바이러스(HCirV-1)와 간염 사이의 일시적 연합을 나타낸다. 환자는 표준 면역 억제 요법을 받았고 TTV 바이러스혈증은 높은 수준의 면역 억제에 유리하지 않았다. 이러한 결과는 Hill의 인과성 기준(Hill's criteria for causality)과 관련하여 평가하여야 한다(Hill AB. The Environment and Disease: Association 또는 Causation? Proc R Soc Med 1965; 58:295-300). 연합의 특이성은 PCR에 의해 검출된 EBV를 제외하고 애고노스틱(agnostic) mNGS를 사용하여 어떠한 다른 바이러스의 부재로 입증되었는데, 이는 간 생검에서 이의 낮은 농도, 혈액에서 수반되는 높은 복제(104.4개의 게놈 사본/mL) 및 간 생검에서 EBV 염색의 음성 결과를 감안할 때 이러한 세포용해의 원인이 아닌 것으로 고려되었다. HCirV-1은 간염이 없는 40명의 대조군이나, 또는 병인이 알려진(50%) 또는 알려지지 않은(50%) 간염이 있는 16명의 대조군에서 qPCR에 의해 입증되지 않았다(표 3). 또한, mNGS에 의해 조사한 처방 당시 병인이 알려지지 않은 57건의 추가 간염 사례에서 HCirV-1은 검출되지 않았다(미공개 결과, 표 4). 전체적으로, 본 발명자는 113명의 대조군에서 HCirV-1 게놈을 검출하지 않았다.

[0225] 시르코바이러스는 DNA 바이러스이다. 중요하게도, HCirV-1 전사체는 특이적인 ISH에 의해 간세포의 2% 핵에서 검출되었다. 따라서, ISH 결과는 바이러스 발현 및 아마도 바이러스 복제와 일치하였다. 시르코바이러스의 용해 주기를 고려할 때, 결과는 간세포를 표적화하여 용해함으로써 간염에서 HCirV-1의 인과적 역할, 및 또한 면역세포독성 반응의 가능성 있는 트리거(trigger)로서 강력히 뒷받침한다.

[0226] 돼지 시르코바이러스(PCV) 1 내지 4와 같은 동물 시르코바이러스는 생식 기능부전, 피부염, 신장병 및 호흡기 질환의 원인이 될 수 있지만 [Sirisereewan 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], 여기서는 발견되지 않았다. 말에서 시르코바이러스와 간염의 연관성이 입증되었다 [Hui A, Altan E, Slovis N, Fletcher C, Deng X, Delwart E. Circovirus in Blood of a Febrile Horse with Hepatitis. Viruses 2021; 13:944]. 돼지 새끼에게 PCV3를 접종한 후, 바이러스 혈증은 점진적으로 최대 108.9개의 카피/mL까지 증가하였는데, 이는 본 발명자의 발견과 유사하지만, 일반적으로 본 발명자가 확인한 보다 지연된 피크와는 대조적으로 감염 후 21일(dpi)에 최고이었다. 병리학적 병변 및 PCV3 항원은 간(간 소엽 기질, 간동 비동전정부 벽(hepatic sinus antral wall), 비동(sinus)의 세포질에서 검출된 PCV-3 항원을 지닌 백회색 결절과 괴사의 존재(Fujiwara K, Kojima H, Yasui S, et al. Hepatitis A viral load in relation to severity of the infection. Journal of Medical Virology 2011; 83:201-207) 및 다른 기관(폐, 심장, 신장, 림프절, 비장, 및 소장)에서 검출되었다 [Jiang H, Wang D, Wang J, et al. Induction of Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome in Piglets by Infection with Porcine Circovirus Type 3. Journal of Virology 2019; 93:e02045]. 흥미롭게도, PCV3 바이러스혈증은 140 dpi에서도 여전히 관찰될 수 있었는데 [Opriessnig T, Prickett JR, Madson DM, et al. 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], 이는 환자에게 설명된 바와 같이 장기 감염을 지속하는 시르코바이러스

능력의 지표이다. 타당성과 관련하여, 약물 병인 또는 병리학적 증거에 대한 일시적 연관성은 없었다. 일반적인 간염 바이러스 감염은 배제되었다. EBV는 양성이었지만, EBV 바이러스 부하가 104 gc/ml에서 안정적으로 유지되었고(도 4) EBER 염색이 음성이었으므로 EBV의 병원성 역할은 배제되었다. HCirV-1의 첫번째 검출은 간 병리학 이전이었고, 더 정확히 말해서 첫 번째와 두 번째 바이러스 부하 피크는 각각 첫 번째와 두 번째 세포용해 피크 이전이었고, 세 번째 바이러스 부하 피크는 세포용해 피크와 동시에 나타났다(도 4). HCirV-1의 높은 바이러스 부하(1010 gc/ml)는 또한 간염에서 HCirV-1의 인과적 역할을 선호한다. 게다가, 높은 바이러스 부하와 질병의 심각성 사이에는 조혈 줄기 세포 이식 수혜자의 HBV [Yu SJ, 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, et al. Hepatitis A viral load in relation to severity of the infection. Journal of Medical Virology 2011; 83:201-207] 또는 아데노바이러스에 대한 강력한 관계가 기술되었다[Lion T, Baumgartinger R, Watzinger F, et al. Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. Blood 2003; 102:1114-1120]. 따라서, 바이러스 부하는 장기 병리학에 영향을 미친다 [Funk GA, Gosert R, Hirsch HH. Viral dynamics in transplant patients: implications for disease. The Lancet Infectious Diseases 2007; 7:460-472]. 현재까지, 본 발명자는 감염원을 확인하지 못하였다. 구체적으로, 본 발명자는 이것이 동물 바이러스의 스필오버(spillover) 때문인지 또는 이것이 밝혀지지 않은 인간 바이러스의 첫 번째 확인 사례인지 알지 못한다. HCirV-1은 이전에 인간 바이롬(virome)의 일부로 확인되지 않았다. 본 발명자는 이것이 동물성 기원일 수 있고, 가능하게는 E형 간염 바이러스와 유사한 방식으로 식이 공급원에서 유래되었을 수 있다고 예상한다. 계통학적 분석은 이러한 바이러스를 가장 가까운 알려진 바이러스와 멀리 두었고, 이는 자체적으로 환자의 공급원이 될 수 없는 야생의 이국적인 동물이 숙주로 하고 있다. 특이적인 항체 시험의 개발은 바이러스의 생태를 해독하고 전파 메커니즘을 더 잘 이해하는 데 도움이 될 것이다.

[0227] 표 2에 나타낸 바와 같이, HCirV-1은 타액, 소변 및 대변에서 배출되었으므로, 접촉자에게 전파될 가능성이 있으며, 이는 아직 조사 중이다.

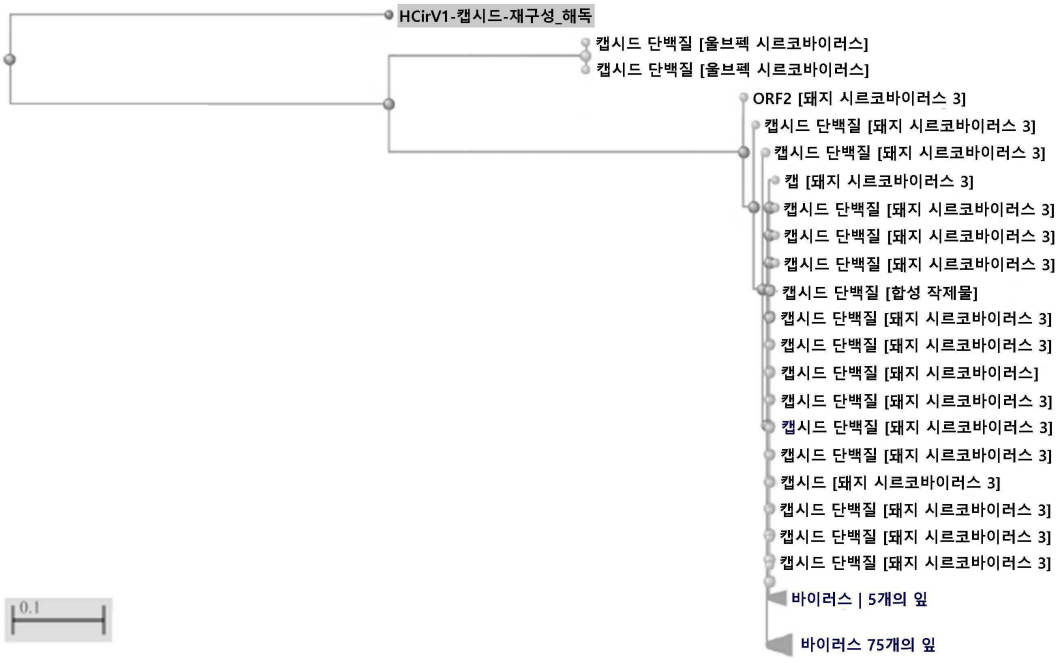
[0228] **동일계 내 하이브리드화(in situ hybridization)**

[0229] ViewRNA ISH 조직 검정 키트 2-플렉스(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 바이러스 복제의 특징으로서 HCirV-1의 RNA 서열을 검출하였다. 12개와 20개의 맞춤형 bDNA 프로브의 칵테일을 HCirV-1의 캡시드와 Rep 유전자 각각을 표적화하기 위해 설계하였고, 빨간색 신호(키트의 "프로브 유형 1"으로서)로 나타내었다. 인간 GAPDH, ACTB 및 PPI 전사체를 표적화하는 대조군 프로브의 혼합물은 파란색 신호(키트의 "프로브 유형 6")로 나타내었다. RNA 표적을 밝히기 위해, 조직 절편(크실렌을 사용하여 파라핀 제거 후)을 20분 동안 열 예비처리 및 15분 동안 프로테아제 분해로 예비처리하였다. 해리스 헤마톡실린을 대조염색에 사용하였다. ISH에 사용된 음성 간 생검 대조군은 제조업체에서 권장한 바와 같이 HCiV-1에 감염된 환자로부터의 프로브가 없는 음성 대조군 및 mNGS을 사용한 HCirV-1에 대해 음성으로 시험된 상이한 환자로부터의 음성 대조군을 포함하였다(이러한 슬라이드는 전체 과정 검정을 거쳤다).

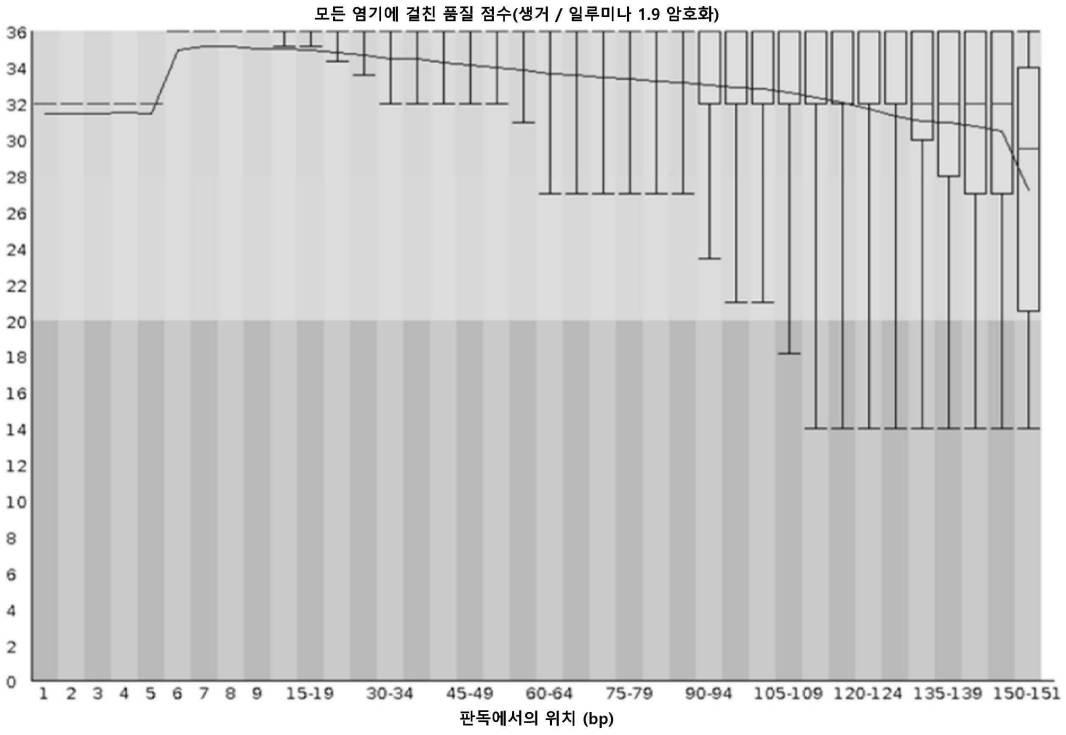
[0230] 동일계 내 하이브리드화(*In situ* hybridization; ISH)는 간 생검에서 감염된(적색 신호) 간세포가 2%임을 나타내었다(도 7). 적색 표지는 핵에서 강하였고 세포질에서는 약하였다. 일부 간세포는 핵에서 적색 표지가 불량하였고 세포질에서 적색 표지가 음성이었다. 내피 세포 및 림프구는 감염되지 않았다. 음성 대조군에서는 적색 신호는 기록되지 않았다. ISH에 의한 간세포에서 HCirV-1 발현의 검출, 다른 간염 병인의 배제, 및 심각한 세포용해와 간 및 혈액에서 매우 높은 HCirV-1 부하의 일시적 연관성은 인과 관계를 강력히 시사한다. 더욱이, 면역저하된 환자(이식 수혜자 포함)에서 mNGS를 사용한 본 발명자의 경험과 이러한 환자의 대표적 코호트(cohort)에서 본 발명자가 수행한 특정 qPCR은 TTV와 달리, HCirV-1이 공생 바이러스 군집(commensal viral flora)의 일부가 아님을 입증하였다.

도면

도면1

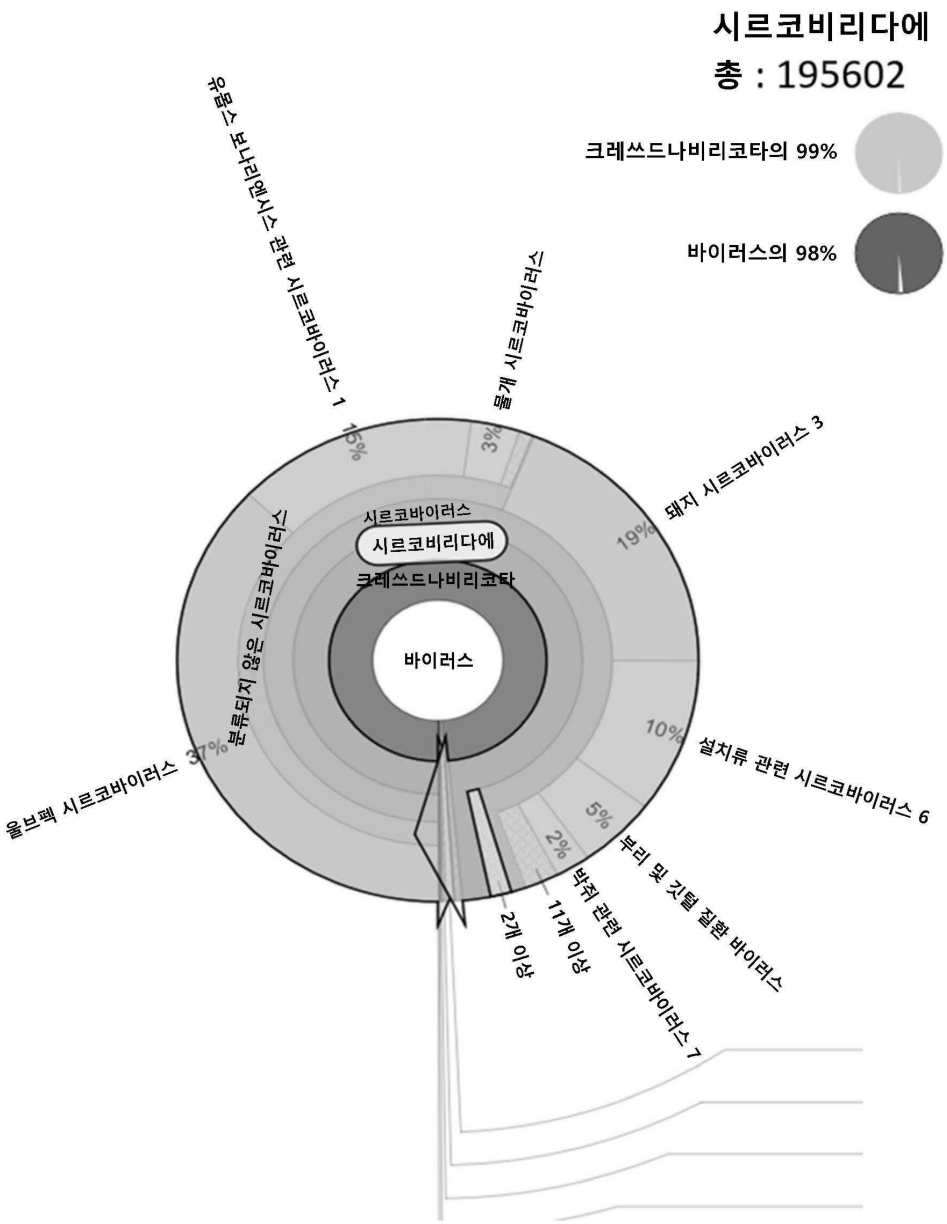


도면2

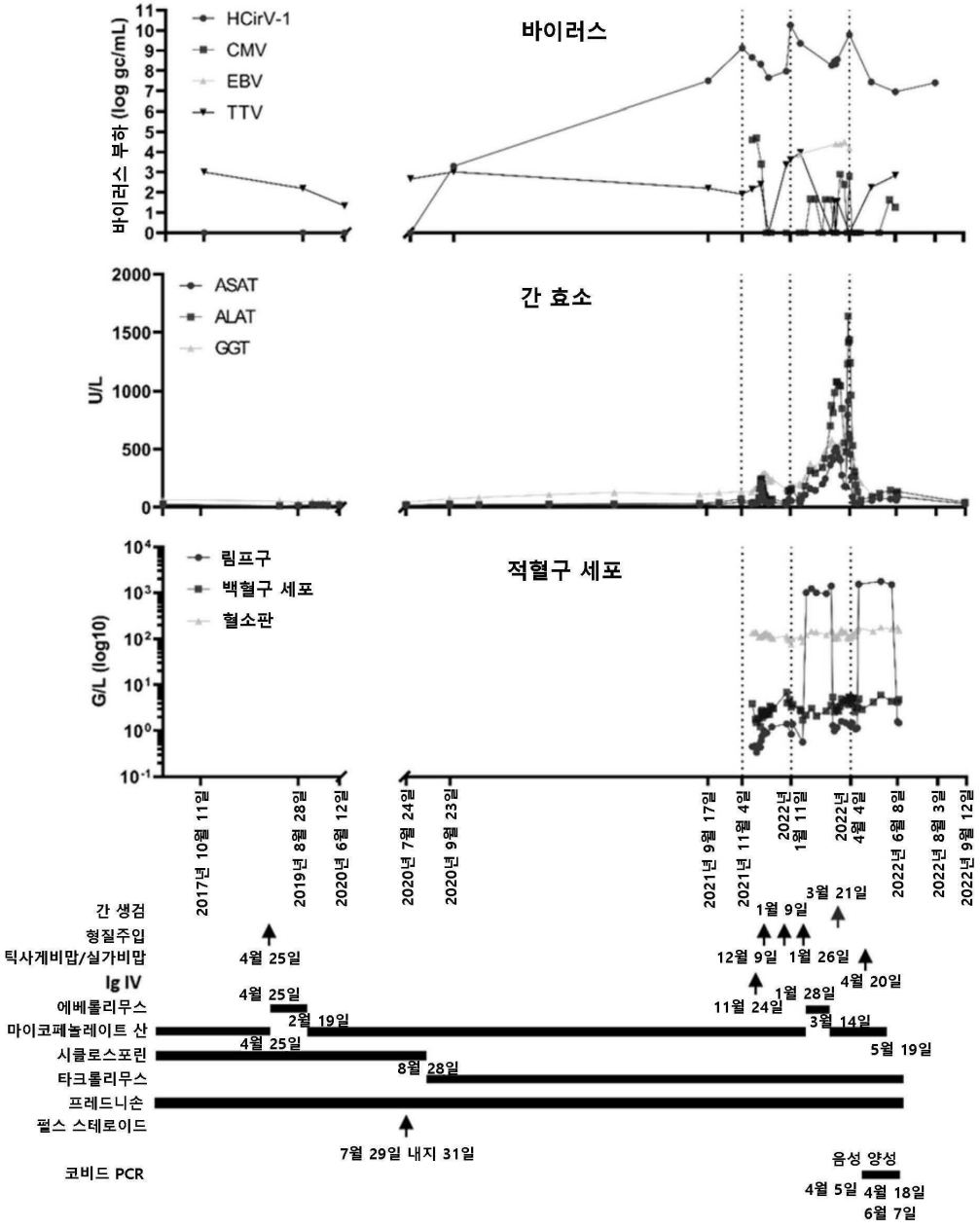


미가공 서열에서의 품질 점수 (Q 점수)

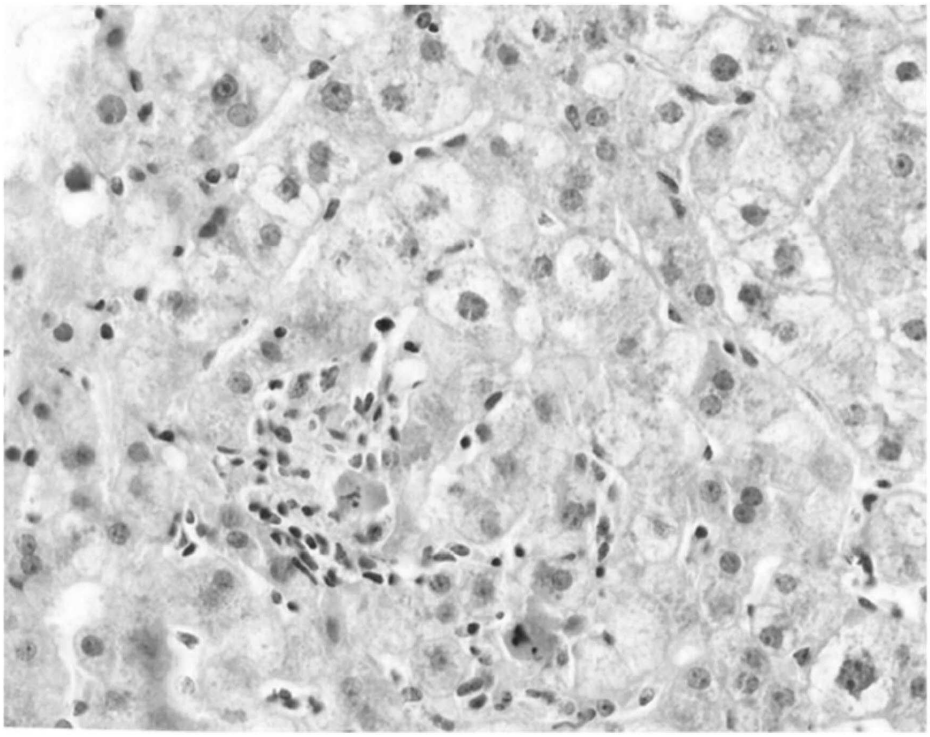
도면3


시르코비리다에
총 : 195602
크레쓰드나비리코타의 99%
바이러스의 98%
유룸스 보나리엔시스 관련 시르코바이러스 1
15%
물개 시르코바이러스
3%
돼지 시르코바이러스 3
19%
설치류 관련 시르코바이러스 6
10%
부리 및 깃털 질환 바이러스
5%
박쥐 관련 시르코바이러스 7
2%
11개 이상
2개 이상
울브펙 시르코바이러스
37%
분류되지 않은 시르코바이러스
시르코바이러스
시르코비리다에
크레쓰드나비리코타
바이러스

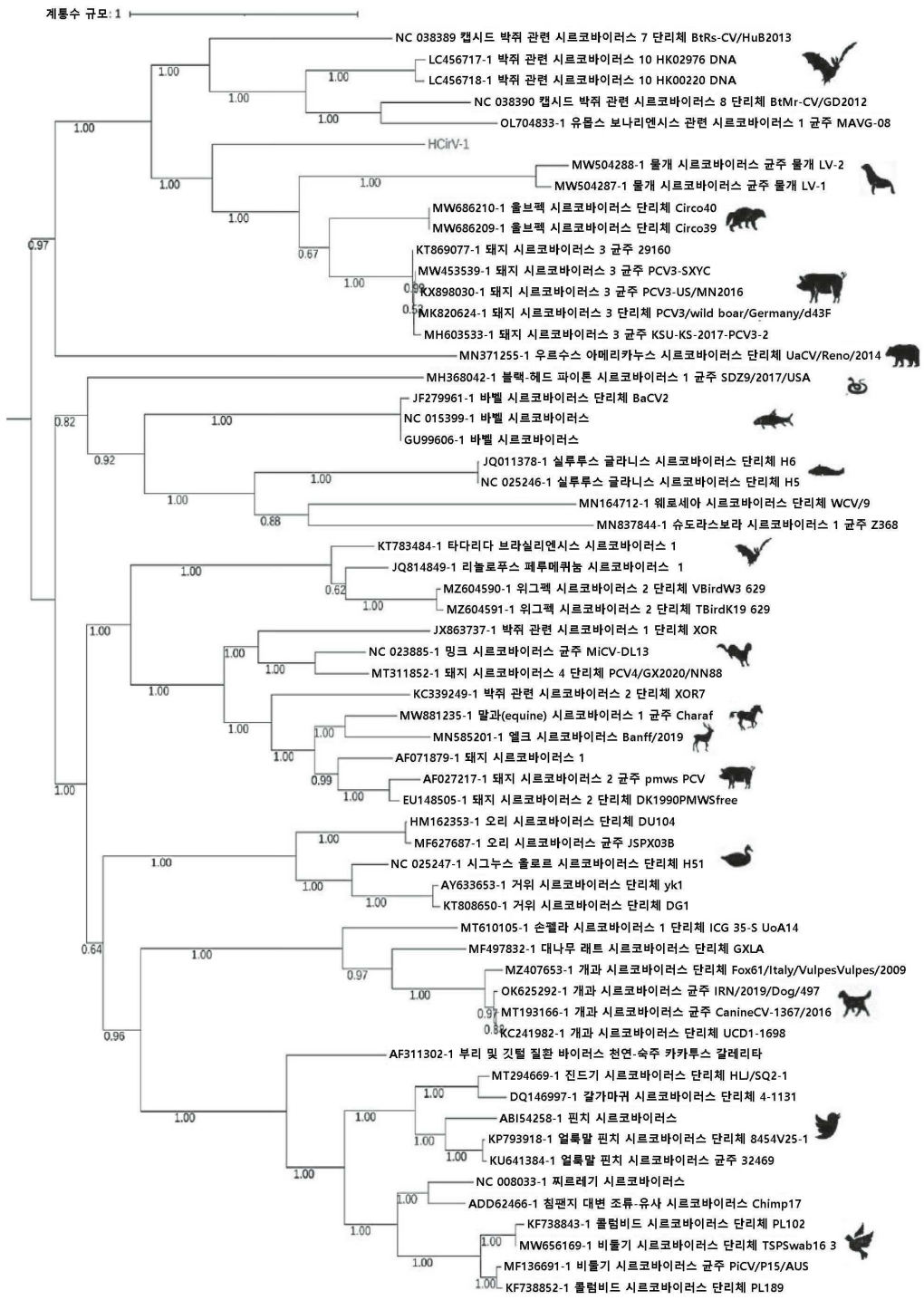
도면4


바이러스
HCirV-1
CMV
EBV
TTV
바이러스 부하 (log gc/mL)
간 효소
ASAT
ALAT
GGT
U/L
적혈구 세포
림프구
백혈구 세포
혈소판
G/L (log10)
2017년 10월 11일
2019년 8월 28일
2020년 6월 12일
2020년 7월 24일
2020년 9월 23일
2021년 9월 17일
2021년 11월 4일
2022년 1월 11일
2022년 4월 4일
2022년 6월 8일
2022년 8월 3일
2022년 9월 12일
간 생검
형질주입
틱사게비맙/실가비맙
Ig IV
에베롤리무스
마이코페놀레이트 산
시클로스포린
타크롤리무스
프레드니손
펄스 스테로이드
코비드 PCR
4월 25일
4월 25일
2월 19일
4월 25일
8월 28일
7월 29일 내지 31일
1월 9일
3월 21일
12월 9일
1월 26일
4월 20일
11월 24일
1월 28일
3월 14일
5월 19일
음성 양성
4월 5일
4월 18일
6월 7일

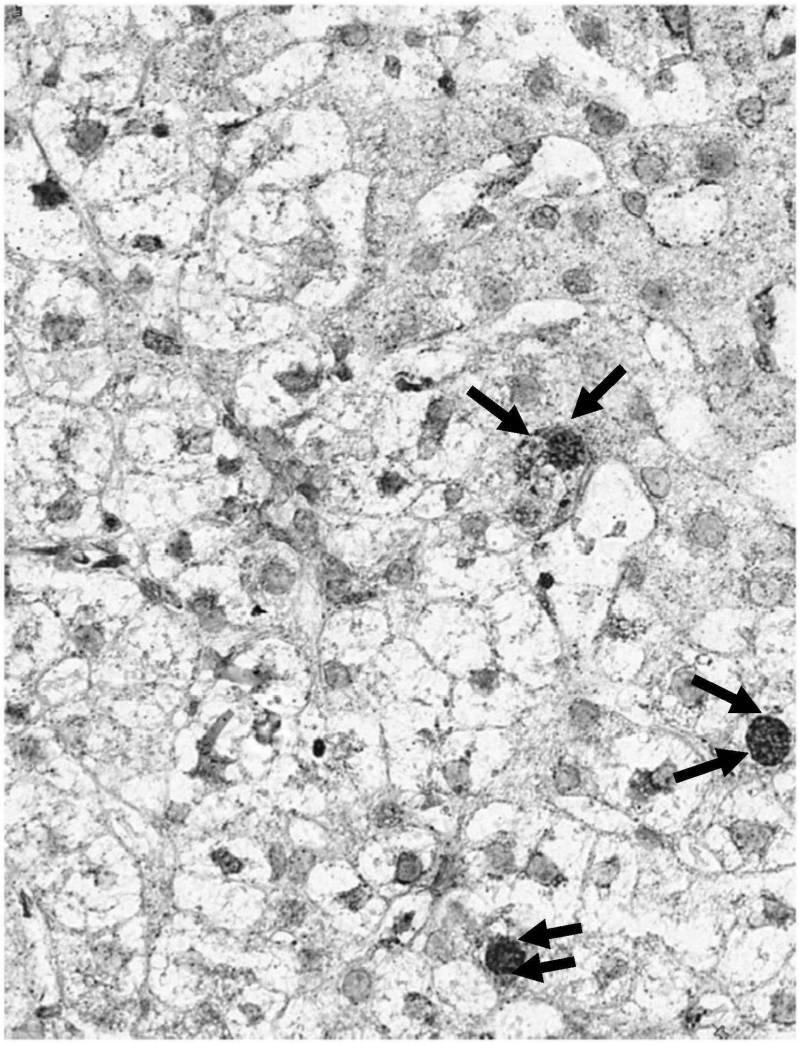
도면5



도면6


계통수 규모: 1
NC 038389 캡시드 박쥐 관련 시르코바이러스 7 단리체 BtRs-CV/HuB2013
LC456717-1 박쥐 관련 시르코바이러스 10 HK02976 DNA
LC456718-1 박쥐 관련 시르코바이러스 10 HK00220 DNA
NC 038390 캡시드 박쥐 관련 시르코바이러스 8 단리체 BtMr-CV/GD2012
OL704833-1 유몹스 보나리엔시스 관련 시르코바이러스 1 균주 MAVG-08
HCirV-1
MW504288-1 물개 시르코바이러스 균주 물개 LV-2
MW504287-1 물개 시르코바이러스 균주 물개 LV-1
MW686210-1 울브팩 시르코바이러스 단리체 Circo40
MW686209-1 울브팩 시르코바이러스 단리체 Circo39
KT869077-1 돼지 시르코바이러스 3 균주 29160
MW453539-1 돼지 시르코바이러스 3 균주 PCV3-SXYC
KX898030-1 돼지 시르코바이러스 3 균주 PCV3-US/MN2016
MK820624-1 돼지 시르코바이러스 3 단리체 PCV3/wild boar/Germany/d43F
MH603533-1 돼지 시르코바이러스 3 균주 KSU-KS-2017-PCV3-2
MN371255-1 우르수스 아메리카누스 시르코바이러스 단리체 UaCV/Reno/2014
MH368042-1 블랙-헤드 파이톤 시르코바이러스 1 균주 SDZ9/2017/USA
JF279961-1 바벳 시르코바이러스 단리체 BaCV2
NC 015399-1 바벳 시르코바이러스
GU99606-1 바벳 시르코바이러스
JQ011378-1 실루루스 글라니스 시르코바이러스 단리체 H6
NC 025246-1 실루루스 글라니스 시르코바이러스 단리체 H5
MN164712-1 웨로세아 시르코바이러스 단리체 WCV/9
MN837844-1 슈도라스보라 시르코바이러스 1 균주 Z368
KT783484-1 타다리다 브라실리엔시스 시르코바이러스 1
JQ814849-1 리놀로푸스 페루메쿠눔 시르코바이러스 1
MZ604590-1 위그팩 시르코바이러스 2 단리체 VBirdW3 629
MZ604591-1 위그팩 시르코바이러스 2 단리체 TBirdK19 629
JX863737-1 박쥐 관련 시르코바이러스 1 단리체 XOR
NC 023885-1 밍크 시르코바이러스 균주 MiCV-DL13
MT311852-1 돼지 시르코바이러스 4 단리체 PCV4/GX2020/NN88
KC339249-1 박쥐 관련 시르코바이러스 2 단리체 XOR7
MW881235-1 말과(equine) 시르코바이러스 1 균주 Charaf
MN585201-1 엘크 시르코바이러스 Banff/2019
AF071879-1 돼지 시르코바이러스 1
AF027217-1 돼지 시르코바이러스 2 균주 pmws PCV
EU148505-1 돼지 시르코바이러스 2 단리체 DK1990PMWSfree
HM162353-1 오리 시르코바이러스 단리체 DU104
MF627687-1 오리 시르코바이러스 균주 JSPX03B
NC 025247-1 시그누스 올로르 시르코바이러스 단리체 H51
AY633653-1 거위 시르코바이러스 단리체 yk1
KT808650-1 거위 시르코바이러스 단리체 DG1
MT610105-1 손첼라 시르코바이러스 1 단리체 ICG 35-S UoA14
MF497832-1 대나무 래트 시르코바이러스 단리체 GXLA
MZ407653-1 개과 시르코바이러스 단리체 Fox61/Italy/VulpesVulpes/2009
OK625292-1 개과 시르코바이러스 균주 IRN/2019/Dog/497
MT193166-1 개과 시르코바이러스 균주 CanineCV-1367/2016
KC241982-1 개과 시르코바이러스 단리체 UCD1-1698
AF311302-1 부리 및 깃털 질환 바이러스 천연-숙주 카카투스 갈레리타
MT294669-1 진드기 시르코바이러스 단리체 HLJ/SQ2-1
DQ146997-1 갈가마귀 시르코바이러스 단리체 4-1131
ABI54258-1 핀치 시르코바이러스
KP793918-1 얼룩말 핀치 시르코바이러스 단리체 8454V25-1
KU641384-1 얼룩말 핀치 시르코바이러스 균주 32469
NC 008033-1 찌르레기 시르코바이러스
ADD62466-1 침팬지 대변 조류-유사 시르코바이러스 Chimp17
KF738843-1 롤럼비드 시르코바이러스 단리체 PL102
MW656169-1 비둘기 시르코바이러스 단리체 TSPSwab16 3
MF136691-1 비둘기 시르코바이러스 균주 PiCV/P15/AUS
KF738852-1 롤럼비드 시르코바이러스 단리체 PL189

도면7



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.