

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6097388号
(P6097388)

(45) 発行日 平成29年3月15日(2017.3.15)

(24) 登録日 平成29年2月24日(2017.2.24)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

G O 1 N 33/53 (2006.01)

G O 1 N 33/569 (2006.01)

G O 1 N 33/50 (2006.01)

G O 1 N 33/15 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 Z

G O 1 N 33/53 D

G O 1 N 33/569 L

G O 1 N 33/50 Z

請求項の数 23 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-520775 (P2015-520775)
 (86) (22) 出願日 平成25年7月10日(2013.7.10)
 (65) 公表番号 特表2015-530868 (P2015-530868A)
 (43) 公表日 平成27年10月29日(2015.10.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2013/000765
 (87) 国際公開番号 W02014/008545
 (87) 国際公開日 平成26年1月16日(2014.1.16)
 審査請求日 平成28年4月18日(2016.4.18)
 (31) 優先権主張番号 2012902954
 (32) 優先日 平成24年7月10日(2012.7.10)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア(AU)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 514318828
 ネビアン ブルー マウンテンズ ローカ
 ル ヘルス ディストリクト
 オーストラリア ニューサウスウェールズ
 州 キングズウッド ダービー ストリー
 ト ネビアン ホスピタル
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インフルエンザにおけるリスクの階層化

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インフルエンザ感染症を有するまたは有することが疑われる患者における臨床的リスクの同定を補助する方法であって、該患者由来の生物試料中のインターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子の発現レベルを決定する段階、および決定されたIFI27遺伝子産物レベルを標準レベルと比較する段階を含む、方法。

【請求項 2】

(i) IFI27遺伝子産物の標準レベルが臨床的リスクなしを示しており、標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27遺伝子産物レベルが、患者における臨床的リスクを示す、または

(ii) 標準レベルが、健康な対象、インフルエンザに感染した無症候性の対象、またはインフルエンザに感染しているが重度の疾患を発症していない対象におけるIFI27遺伝子産物レベルに基づく、または

(iii) IFI27遺伝子産物の標準レベルが臨床的リスクを示しており、標準レベルと比較して患者の試料中の同等であるかまたは高いIFI27遺伝子産物レベルが、患者における臨床的リスクを示す、または

(iv) 標準レベルが、健康な対象におけるIFI27遺伝子産物レベルに基づいており、標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27遺伝子産物レベルが、患者における臨床的リスクを示す、または

(v) 標準レベルが、インフルエンザウイルスに感染した無症候性の対象におけるIFI27

遺伝子産物レベルに基づいており、標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27遺伝子産物レベルが、患者における臨床的リスクを示す、請求項1記載の方法。

【請求項3】

(i) 標準レベルが、IFI27遺伝子産物の1つまたは複数の既知試料を、患者由来の生物試料と同じIFI27遺伝子発現レベルの決定法に供することによって調製され、IFI27遺伝子産物の1つまたは複数の既知試料が、臨床的リスクを示すある既定量または複数の既定量の試料であり、標準レベルと比較して患者の試料中の同等であるかまたは高いIFI27遺伝子産物レベルが、患者における臨床的リスクを示す、または

(ii) 標準レベルが、IFI27遺伝子産物の1つまたは複数の既知試料を、患者由来の生物試料と同じIFI27遺伝子発現レベルの決定法に供することによって調製され、IFI27遺伝子産物の1つまたは複数の既知試料が、臨床的リスクなしを示すある既定量または複数の既定量の試料であり、標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27遺伝子産物レベルが、患者における臨床的リスクを示す、請求項1記載の方法。

【請求項4】

インフルエンザを有する患者の経過をモニターする方法であって、患者由来の第一の生物試料中のIFI27遺伝子の発現レベルを決定する段階、および患者由来の第二の生物試料中のIFI27遺伝子の発現レベルを決定する段階であって、第一および第二の試料が異なる時期に患者から得られる、段階、ならびに

第一および第二の試料中のIFI27の相対的発現レベルに基づいて患者の状態の評価を補助する段階を含む、方法。

【請求項5】

第一の生物試料と比較した第二の生物試料中のIFI27遺伝子の発現レベルの増加が、患者における臨床的リスクの増加を示す、請求項4記載の方法。

【請求項6】

第一の生物試料と比較した第二の生物試料中のIFI27遺伝子の発現レベルの低下が、患者における臨床的リスクの低下を示す、請求項4記載の方法。

【請求項7】

患者由来の生物試料中のインターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子の発現レベルを決定する段階、および決定されたIFI27遺伝子産物レベルを標準レベルと比較する段階を含む、患者におけるインフルエンザまたはウイルス性肺炎の臨床的リスクの同定を補助する方法。

【請求項8】

(i) 標準レベルが、健康な対象におけるIFI27遺伝子産物レベルに基づいており、標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27レベルが、患者におけるインフルエンザまたはウイルス性肺炎を示す、または

(ii) 標準レベルが、細菌性肺炎を有する対象におけるIFI27遺伝子産物レベルに基づいており、標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27遺伝子産物レベルが、インフルエンザまたはウイルス性肺炎を有する患者であることを示す、請求項7記載の方法。

【請求項9】

患者がウイルス性肺炎または細菌性肺炎を有することが疑われる、請求項7記載の方法。

【請求項10】

(i) 生物試料中の少なくとも1つの追加の遺伝子、または
(ii) その発現が構成的である遺伝子である、少なくとも1つの追加の遺伝子、または
(iii) GAPDH遺伝子である、少なくとも1つの追加の遺伝子の発現レベルを決定する段階をさらに含む、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項11】

生物試料が、血液、または血球サブセット、RNA、mRNA、cDNA、もしくはタンパク質などその成分である、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 2】

決定する段階が、生物試料に、IFI27遺伝子産物に結合することができる物質を接触させる段階、および該物質とIFI27遺伝子産物との結合を検出する段階を含み、

(i) IFI27遺伝子産物が、IFI27 mRNAまたはその断片である、または

(ii) IFI27遺伝子産物が、SEQ ID NO:1の核酸配列またはその断片もしくは変種、またはSEQ ID NO:2の核酸配列またはその断片もしくは変種を含む、または

(iii) IFI27遺伝子産物が、IFI27ポリペプチドまたはその断片もしくは変種である、または

(iv) IFI27遺伝子産物が、SEQ ID NO:3の配列を含むアミノ酸配列またはその断片もしくは変種を含むか、またはSEQ ID NO:4の配列を含むアミノ酸配列またはその断片もしくは変種を含む、

請求項1～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 3】

SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むIFI27ポリペプチド、またはその抗原性断片もしくは変種に選択的に結合することができる抗体を試料に接触させる段階を含む、請求項12記載の方法。

【請求項 1 4】

ELISAを行う段階を含む、請求項12または13記載の方法。

【請求項 1 5】

生物試料中の決定されたIFI27遺伝子産物レベルを標準レベルまたは第二の生物試料と比較する段階が、コンピュータプログラムの補助によって行われる、請求項1～14のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 6】

生物試料中のインターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子産物レベルを決定するための、請求項1～15のいずれか一項記載の方法において使用されるキットであって、IFI27遺伝子産物の存在を検出するための少なくとも1つの物質を含む、キット。

【請求項 1 7】

少なくとも1つの物質が、以下からなる群から選択される、請求項16記載のキット、

(i) プライマー、抗体、またはプローブ、または

(ii) SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6に示される配列から選択される核酸配列またはその変種もしくは断片に対して特異的なプライマーまたはプローブ、

(iii) SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6に示される配列から選択される核酸配列またはその変種もしくは断片を選択的に増幅することができるフォワードおよびリバースプライマー、または

(iv)

SEQ ID NO:7 (acctcatcagcagtgaccagt), SEQ ID NO:8

(acatcatcttggtgctatgg), SEQ ID NO:9 (TGCCTCGGGCAGCCT) およびSEQ ID

NO:10 (TTGGTCAATCCGGAGAGTCC)

からなる群より選択される1つまたは複数の核酸配列、または同じ標的配列に特異的に結合することができるその配列変種、または

(v) IFI27遺伝子配列によってコードされるポリペプチドまたはその断片もしくは変種に特異的に結合することができる抗体。

【請求項 1 8】

抗体が、IFI27に対して特異的なコンジュゲート抗体、ポリクローナル抗体、またはモノクローナル抗体からなる群から選択される、請求項17記載のキット。

【請求項 1 9】

10

20

30

40

50

(a) 抗体が、エピトープ配列：
 MEASALTSSAVTSAKVVVRVASGSAVVLPARIATVVIGGVVAVPMVLSAMGFTAAGIAS
 SSIAAKMMSAAAIANGGGVASGSLVATLQSLGATGLSGLTKFILGSIGSAIAAVIARFY

に結合する、または

(b) 抗体が、(i) SEQ ID NO:3に示されるアミノ酸配列を含むIFI27ポリペプチド、または(ii) SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むIFI27ポリペプチド、または(iii) (i)もしくは(ii)の抗原性断片もしくは変種に選択的に結合することができる、請求項17または18記載のキット。

【請求項20】

10

前記キットが1つまたは複数の較正された標準を含み、該標準がIFI27遺伝子産物の既知濃度を含む、請求項17～19のいずれか一項記載のキット。

【請求項21】

(i) 1つまたは複数の参照試料；(ii) 1つまたは複数の検出可能な部分；(iii) 固相支持体上にIFI27遺伝子産物を検出するための物質を固定するための1つまたは複数の物体；(iv) 固相支持体材料；(v) 生物試料を採取および/または保存するための1つまたは複数の容器；(vi) 生物試料の調製に用いるための1つまたは複数の試薬；(vii) 核酸配列を増幅するための1つまたは複数の物質；ならびに(viii) 生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルを決定するための方法におけるキットまたはその成分の使用説明書からなる群より選択される1つまたは複数の追加の成分を含む、請求項17～20のいずれか一項記載のキット。

20

【請求項22】

個体におけるインフルエンザを処置するための物質の有効性またはインフルエンザウイルスに曝露された個体における疾患の重症度を低下させるための物質の有効性を評価するための方法であって、

該物質を投与された個体由来の生物試料中のインターフェロン誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子産物レベルを決定する段階、および決定されたレベルを標準レベルと比較する段階を含む、方法。

【請求項23】

30

(i) 前記個体が、前記物質の投与前にインフルエンザウイルスに曝露された個体である、または

(ii) 前記個体が、前記物質の投与時にインフルエンザ感染症を有している個体である、または

(iii) 前記個体が、前記物質の投与後にインフルエンザウイルスに曝露された個体である、または

(iv) 方法が、前記物質を投与する前の前記個体から得られた生物試料中のIFI27遺伝子産物のレベルを決定する段階をさらに含む、または

(v) 前記物質を投与する前の前記個体から得られた生物試料中のIFI27遺伝子産物のレベルと比較して、前記物質を投与された個体由来の生物試料中の低いIFI27遺伝子産物レベルが、インフルエンザウイルスに曝露されたまたはインフルエンザ感染症を有する患者における疾患の重症度を前記物質が低下させることができることを示す、または

40

(vi) 方法が、インフルエンザの予防または処置のための候補抗ウイルス剤の研究試験または臨床試験の一部として行われる、請求項22記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インフルエンザを有するまたは有することが疑われる患者における臨床的リスクの同定法に関する。本発明はまた、インフルエンザまたはウイルス性肺炎を有する患

50

者と、症状が類似の状態を有する患者とを区別する方法にも関する。本発明の方法は、インフルエンザを有するまたは有することが疑われる患者の生物試料中のインターフェロン誘導タンパク質27 (IFI27) の発現レベルを決定する段階を含む。本方法の実行によって適した成分を含むキットもまた、本発明によって提供される。本発明によって、臨床的リスクを定義する群、たとえば対象の長期間の健康に対するリスクの重症度に基づく群への患者の階層化が可能となる。

【背景技術】

【0002】

背景

インフルエンザ/肺炎は、米国における死因の上位10位中8位にランクすると報告されている。インフルエンザウイルス感染症は、毎年、世界全体で最も多くの人々に罹患する最も一般的な感染疾患を表す。インフルエンザは、季節性の流行時には世界全体に急速に広がって、入院という相当な負荷を課す。世界全体で評価することは難しいが、世界保健機構 (WHO) は、年間の流行時の有病率が、重度の疾患で300万から500万例であり、および世界全体での死亡率は年間250,000から500,000例であると推定している。WHOによれば、アメリカにおいて、インフルエンザの流行は、上気道感染症を有するアメリカ人集団の5~15%に影響を及ぼし、入院および死亡は主に高リスク群 (高齢者および慢性疾患を有する人など) で起こり、結果としてアメリカ経済が被るその費用は年間710~1670億ドルに上ると推定されている。先進国におけるインフルエンザによる死亡の多くは年齢65歳以上の高齢者に起こっている。結果として起こる経済的費用と共に、感染症が流行すること、および患者の苦痛に関するその潜在的重症度により、感染症を検出して処置することは、医療制度の中でも優先順位が高い。

【0003】

臨床的見通しから、重度の疾患を発症するリスクがより高いインフルエンザ感染症を有する患者を同定できなければ、そのような高リスク患者にとって適切な処置の送達が遅れ、患者の回復および長期間の健康にとって甚大な結末を有しうる。重度の疾患へと進行した患者では、平均で5~7日の処置の遅れあることが、文献において一貫して報告されている。時宜を得て集中治療を行うことは、インフルエンザによる死亡リスクの低下に関連することから、重度の疾患へと進行するリスクを有する患者における処置の遅れを回避することは極めて重要である。たとえば、症状の発症から入院までの1日の遅延により、インフルエンザ (H1N1) による死亡のリスクが5.5%増加することが報告されている¹。

【0004】

インフルエンザ感染症は、しばしば臨床的背景のみ (たとえば、インフルエンザ様症状の既往) に基づいて疑われ、公式のいかなる臨床検査もなく、人は抗ウイルス薬によって処置される。それゆえ臨床での決定は必ずしも、人がインフルエンザウイルスを有するか否かに関して行われるのではなく、その人を入院させるべきか否かまたは安全に自宅に帰すべきかに関して行われる。この文脈において、インフルエンザウイルスの存在に関する診断試験は、不要でありうる。その代わりに、医師は、患者がどのように適切にインフルエンザ感染症に応答するかを定量化するために医師の補助となり得る、最終的に疾患の重症度を決定する試験を必要とする。疾患の重症度がより高ければ、感染した対象が悪化する可能性はより高くなり、それゆえ入院の必要性が増す。

【0005】

現在、インフルエンザ感染症の重症度を信頼可能に評価することができるいくつかの臨床検査法が存在する。インフルエンザ感染症の重症度を評価する方法の一例は、インフルエンザにおけるウイルス複製の程度が疾患の重症度に相関すると考えられていることから、気道試料におけるウイルス量の試験を伴う。しかし、気道および血清試料に関する研究により、ウイルス量は、疾患の重症度によらず同じであることが示されている^{2,12}。このことは、インフルエンザ感染症の重症度が必ずしも、感染の結果として表れる疾患の重症度と相関しないことを証明している。

【0006】

10

20

30

40

50

したがって、様々な理由から、診断試験は、インフルエンザウイルスの有無を決定することができ、それゆえ医師を補助しうるが、ウイルスの存在は、感染患者における疾患進行の実際の原因でありうる異常な免疫応答に必ずしも等しくない可能性があることから、診断試験は、臨床での決定に影響を与えるには不十分でありうる。

【0007】

確認されたインフルエンザ感染症を有する、またはインフルエンザ感染症の症状を有する人に時宜を得た適切な処置を提供するために、感染症による疾患の重症度または可能性がある疾患の重症度を評価する特異的試験が必要である。そのような重症度階層化ツールは、そのような患者の管理を助けるであろう。そのようなツールによって、医師は、安全に自宅に帰することができる患者を同定することができ、一方、より重度の疾患を有すると同定された、またはより重度の疾患を発症するリスクがより高い患者を、さらに観察および処置するために入院させることができる。そのようなツールはまた、ごく軽度症状を有しうるが、おそらく重度の疾患を発症する可能性がある患者における疾患の進行を停止させるまたは遅らせるために、予防的手段を用いる機会を医師に与える。

10

【0008】

臨床での決定を行うのを助けるための予後および診断情報の提供を補助するために、インフルエンザを有するまたは有することが疑われる個体を評価するための改善された方法が必要である。

【発明の概要】

【0009】

20

概要

本発明者らは、患者が重度の疾患のいかなる徴候も示す前に、病院または臨床環境での医学的介入をおそらく必要とするインフルエンザ患者（患者が確認されているおよび／または症候性であるか否かによらず）と、おそらく安全に自宅に帰ることができる患者とを識別することができる方法があれば、医師がより良い処置の決定を下すのを大きく補助するであろうと認識している。

【0010】

本発明は少なくとも部分的に、対象におけるインターフェロン 誘導タンパク質27（IF127）遺伝子の発現レベルが、その対象におけるインフルエンザ感染症によって引き起こされる疾患の重症度と相関することが本発明らによって同定されたことに基づいている。相関は、対象がインフルエンザ感染症または重度の疾患の症状を示す前に、対象の感染症により生じる疾患の重症度を予測するために用いられる。本発明は、患者による応答が不十分であることを示しうるインフルエンザ感染症の際の宿主応答の特定の局面、および病院または臨床環境での医学的介入を必要とする重度の疾患を発症する可能性を検出する方法に関する。態様において、本発明の方法は、どの人が臨床的リスクを有するか、すなわちどの人が入院またはさらに生命維持治療などの医学的介入の必要を特徴とする感染症により生じる重篤な疾患を発症する可能性がより高いかを決定するために、インフルエンザ感染症を有する患者を評価するために用いられる。

30

【0011】

本発明は、インフルエンザ感染症の初期管理、感染症に対する患者の免疫応答のモニタリング、および従来の診断アプローチによってそうでなければ見逃されうる有リスク者に対する生命を救う介入を可能にすることなどの医療において応用を有する。本発明者らは、医師の診療所または病院を訪れたインフルエンザ感染症が疑われる患者において、患者が安全に自宅に帰ることができるのか、または入院を必要としうるのかを医師が予測するのを、IF127遺伝子発現レベルが補助することができると想像する。このシナリオにおいて、IF127発現が正常レベルであれば、患者が、インフルエンザを有しないか、または重度の疾患を発症するリスクが高くないこと、すなわちその場合、患者は帰宅してもよいことを示しうる。しかし、IF127発現レベルがアップレギュレートされている場合、インフルエンザ感染症を有し、かつ重度の疾患を発症するリスクがより高い患者であることを示す可能性があり、その場合、患者は病院または臨床環境で医学的介入を必要としうる。

40

50

【0012】

たとえば、インフルエンザ感染症が疑われるが、感染症の症状が比較的軽度である患者が医師の診療所を訪れる場合、通常、最少の投薬で患者は自宅に帰るであろう。しかし、本発明を、患者が臨床的リスクを有するか否かを決定するために用いてもよく、その場合、処置を行う医師は、感染症が重篤な疾患を示す前に、この初期段階で介入を行うことができ、モニタリングおよび処置のために患者を入院させることができるであろう。

【0013】

別の例において、患者は、病院を訪れて、インフルエンザ感染症を有することが確認され、重篤な疾患の発症と一貫するいくつかの症状を示す場合がある。通常、この場合、患者は処置のために入院する可能性がある。しかし、本発明は、患者がインフルエンザ感染症の結果として重度の疾患を実際に発症する可能性があるか否かを予測するために用いられ、医師が人員および資源を適切に割り当てするのを補助しうる。したがって、本発明は、患者が臨床的リスクを有しない、および感染症の結果として重度の疾患を発症しないと予測される場合の、患者の過剰管理を防止しうる。

10

【0014】

さらなる例において、本発明者らは、インフルエンザの流行またはパンデミックに際し、個体がインフルエンザに感染しているか否か、および臨床的リスクを有する患者のために臨床資源を残しておく必要があるか否かを決定することが実現可能でない場合に、本発明が有用なスクリーニングツールを提供しうると想像する。これらのシナリオにおいて、本発明は、インフルエンザ感染症の結果として重度の疾患を発症する臨床的リスクを有するか否かを決定するために、インフルエンザ感染症の任意の徴候を示すまたは示さない可能性がある個体または個体群をスクリーニングするために用いられうる。スクリーニングの際に、IFI27発現レベルが正常であれば、患者はインフルエンザを有しないか、またはインフルエンザを有するが重度の疾患を発症する臨床的リスクを有しないことを示す可能性があり、この場合、モニタリングまたは処置の優先順位を外すことができる。しかし、IFI27発現レベルがアップレギュレートされれば、患者がインフルエンザ感染症を有しかつ重度の疾患を発症するリスクがより高く、したがって臨床的リスクを有する患者であることを示す可能性があり、この場合、患者をさらにモニターおよび処置することができる。

20

【0015】

同様に、本発明者らは、インフルエンザ感染症により入院する患者において、IFI27遺伝子発現レベルは、医師が患者の免疫応答の適切性を予測するのを、および患者がさらに悪化するかまたは回復するかを予測するのを助けることができると想定している。患者がさらに悪化すると予想される場合、その患者に関して集中治療室への入院などの適切な治療プロトコルを実施することができる。または、患者がおそらく回復すると決定されれば、患者が集中治療室での有用な資源を潜在的に占有することなく、患者は標準的な一般病棟内に留まるであろう。本発明者らは、IFI27遺伝子発現レベルがまた、たとえば抗ウイルス剤治療後または患者の状態の処置に関連する他の治療後に、医師が患者を持続的にモニターするのを助けるために用いられうると想像する。

30

【0016】

態様において、本発明は、インフルエンザ感染症が疑われる個体においてIFI27のmRNA発現レベルを測定するための遺伝子発現アッセイを提供する。高レベルのIFI27遺伝子発現は、免疫の代償障害のリスクが有意に増加していることを示し、したがって、患者の臨床状態の悪化が迫っていることを医師に警告する。IFI27遺伝子発現の測定は、重度の疾患を発症する臨床的リスクを示し、入院を必要とする個体と、安全に自宅に帰ることができる個体を正確に区別すること（すなわち、リスクの階層化）によって、医師がその臨床での決定を下すのを補助する。それゆえ、本発明は、インフルエンザの流行およびパンデミックの際の患者の初回トリアージにおいても実用的な用途を有する。

40

【0017】

1つの局面において、本発明は、患者の生物試料中のインターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子の発現レベルを決定する段階、および決定されたIFI27遺伝子産物レ

50

ベルを標準レベルと比較する段階を含む、インフルエンザ感染症を有するまたは有することが疑われる患者における臨床的リスクを同定する方法を提供する。

【0018】

1つの態様において、患者は、A型インフルエンザ、またはB型インフルエンザ感染症、またはそのサブタイプを有するまたは有することが疑われる。1つの態様において、サブタイプは、A型インフルエンザの季節流行株である。1つの態様において、サブタイプは、B型インフルエンザの季節流行株である。

【0019】

1つの態様において、標準的なIFI27遺伝子産物レベルは、臨床的リスクなしを示しており、標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27遺伝子産物レベルが、該患者における臨床的リスクを示す。

10

【0020】

1つの態様において、臨床的リスクなしを示す標準レベルは、健康な対象におけるIFI27レベルに基づく。

【0021】

1つの態様において、標準レベルは、インフルエンザウイルスに感染した無症候性の対象におけるIFI27レベルに基づき、該標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27レベルが、該患者における臨床的リスクを示す。

【0022】

1つの態様において、IFI27遺伝子産物の標準レベルは、臨床的リスクを示しており、標準レベルと比較して患者の試料中の等しいかまたは高いIFI27遺伝子産物レベルが、患者における臨床的リスクを示す。

20

【0023】

1つの態様において、標準レベルは、患者の生物試料中のIFI27遺伝子の発現レベルを決定すると同時に調製される。

【0024】

1つの態様において、健康な対象またはインフルエンザに感染した無症候性の対象に基づく標準レベルより少なくとも40倍から60倍高いIFI27遺伝子産物レベルは、臨床的リスクを示す。

【0025】

30

1つの態様において、健康な対象またはインフルエンザに感染した無症候性の対象に基づく標準レベルより少なくとも60倍高いIFI27遺伝子産物レベルは、臨床的リスクを示す。

【0026】

1つの態様において、標準レベルは、IFI27遺伝子産物の1つまたは複数の既知試料を、患者の生物試料と同じIFI27遺伝子発現レベルの決定法に供することによって調製され、IFI27遺伝子産物の1つまたは複数の既知試料は、臨床的リスクを示すある既定量または複数の既定量の試料であり、標準レベルと比較して患者の試料中の等しいかまたは高いIFI27遺伝子産物レベルが、患者における臨床的リスクを示す。

【0027】

40

1つの態様において、標準レベルは、IFI27遺伝子産物の1つまたは複数の既知試料を、患者の生物試料と同じIFI27遺伝子発現レベルの決定法に供する段階によって調製され、IFI27遺伝子産物の1つまたは複数の既知試料は、臨床的リスクなしを示すある既定量または複数の既定量の試料であり、標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27レベルが、患者における臨床的リスクを示す。

【0028】

1つの態様において、本発明は、第一および第二の試料が、異なる時期に患者から得られる、患者の第一の生物試料中のIFI27遺伝子発現レベルを決定する段階、および患者の第二の生物試料中のIFI27遺伝子発現レベルを決定する段階、ならびに第一および第二の試料中のIFI27の相対的発現レベルに基づいて患者の状態を評価する段階を含む、インフ

50

ルエンザを有する患者の進行をモニターする方法を提供する。1つの態様において、第一の生物試料と比較して第二の生物試料においてIFI27遺伝子の発現レベルが増加していれば、患者における臨床的リスクの増加が示される。1つの態様において、第一の生物試料と比較して第二の生物試料中の低いIFI27遺伝子の発現レベルが、患者における臨床的リスクの低下を示す。

【0029】

別の局面において、本発明は、患者の生物試料中のインターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子の発現レベルを決定する段階、および決定されたIFI27遺伝子産物レベルを、IFI27遺伝子産物の標準レベルと比較する段階を含む、患者におけるインフルエンザまたはウイルス性肺炎を同定する方法を提供する。

10

【0030】

1つの態様において、IFI27遺伝子産物の標準レベルは、健康な対象のIFI27レベルに基づき、該標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27の発現レベルが、患者におけるインフルエンザまたはウイルス性肺炎を示す。

【0031】

1つの態様において、患者は、ウイルス性肺炎または細菌性肺炎を有することが疑われる。

【0032】

1つの態様において、本発明は、標準レベルが細菌性肺炎を有する対象におけるIFI27遺伝子産物レベルに基づき、標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27遺伝子産物レベルが、インフルエンザまたはウイルス性肺炎を有する患者であることを示す、インフルエンザまたはウイルス性肺炎を同定する方法を提供する。

20

【0033】

1つの態様において、健康な対象または細菌性肺炎を有する対象に基づく標準レベルより少なくとも10倍高いIFI27遺伝子産物レベルは、インフルエンザまたはウイルス性肺炎を示す。

【0034】

1つの態様において、健康な対象または細菌性肺炎を有する対象に基づく標準レベルより少なくとも40倍から60倍高いIFI27遺伝子産物レベルは、インフルエンザまたはウイルス性肺炎および臨床的リスクを有する患者であることを示す。

30

【0035】

1つの態様において、健康な対象または細菌性肺炎を有する対象に基づく標準レベルより少なくとも60倍高いIFI27遺伝子産物レベルは、インフルエンザまたはウイルス性肺炎および臨床的リスクを有する患者を示している。

【0036】

以下の態様は、本明細書において記載する本発明の全ての局面に当てはまる。

【0037】

1つの態様において、本発明はさらに、生物試料中の少なくとも1つの追加の遺伝子の発現レベルを決定する段階を含む。1つの態様において、少なくとも1つの追加の遺伝子は、その発現が構成的である遺伝子である。1つの態様において、少なくとも1つの追加の遺伝子は、その発現がインフルエンザ感染症によって影響を受けない遺伝子である。1つの態様において、少なくとも1つの追加の遺伝子はGAPDH遺伝子である。

40

【0038】

1つの態様において、生物試料は、血液、または血球サブセットなど、その成分である。1つの態様において、生物試料は白血球のサブセットを含む。

【0039】

1つの態様において、本方法は、形質細胞様樹状細胞 (pCD) の存在に関して濃縮するために患者からの血液試料を処理する段階を含む。

【0040】

1つの態様において、本方法は、IFI27遺伝子産物に結合することができる物質を生物試

50

料に接触させる段階、および物質とIFI27遺伝子産物との結合を検出する段階を含む。

【 0 0 4 1 】

1つの態様において、生物試料はRNA、mRNA、またはタンパク質である。

【 0 0 4 2 】

1つの態様において、IFI27遺伝子産物は、IFI27 mRNA、またはその断片である。1つの態様において、IFI27遺伝子産物は、SEQ ID NO:1の核酸配列またはその断片もしくは変種を含む。1つの態様において、IFI27遺伝子産物は、SEQ ID NO:2の核酸配列またはその断片もしくは変種を含む。1つの態様において、IFI27遺伝子産物は、アイソフォーム1転写物変種である。1つの態様において、IFI27遺伝子産物は、アイソフォーム2転写物変種である。

10

【 0 0 4 3 】

1つの態様において、IFI27遺伝子産物は、IFI27ポリペプチドまたはその断片もしくは変種である。1つの態様において、IFI27遺伝子産物は、SEQ ID NO:3の配列またはその断片もしくは変種を含むアミノ酸配列を含む。1つの態様において、IFI27遺伝子産物は、SEQ ID NO:4の配列またはその断片もしくは変種を含むアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 4 】

1つの態様において、本方法は、mRNAのcDNAへの逆転写を含む。1つの態様において、IFI27 cDNA配列は、SEQ ID NO:5の配列またはその断片もしくは変種を含む。1つの態様において、IFI27 cDNA配列は、SEQ ID NO:6の配列またはその断片もしくは変種を含む。1つの態様において、本方法は、試料のcDNA配列などのIFI27核酸配列の増幅、および増幅配列を検出する段階を含む。1つの態様において、増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を含む。1つの態様において、ポリメラーゼ連鎖反応は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) を含む。1つの態様において、ポリメラーゼ連鎖反応は、(i) SEQ ID NO:1、(ii) SEQ ID NO:2、(iii) SEQ ID NO:5、(iv) SEQ ID NO:6の配列、および(v) SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6のいずれかの断片または変種から選択される核酸配列を増幅することができる1つまたは複数のプライマーを利用する。

20

【 0 0 4 5 】

1つの態様において、ポリメラーゼ連鎖反応は、

SEQ ID NO:7 (acctcatcagcagtgaccagt) および SEQ ID NO:8 (acatcatcttggctgctatgg)

30

のプライマー配列、または同じ標的配列を増幅することができるその配列変種の1つまたは両方を利用してもよい。1つの態様において、ポリメラーゼ連鎖反応は、

SEQ ID NO:9 (TGCCTCGGGCAGCCT) および SEQ ID NO:10

(TTGGTCAATCCGGAGAGTCC)

のプライマー配列、または同じ標的配列を増幅することができるその配列変種の1つまたは両方を利用してもよい。

【 0 0 4 6 】

1つの態様において、本方法は、IFI27遺伝子産物またはその断片もしくは変種に特異的に結合することができる1つまたは複数のプローブを、試料に接触させる段階を含む。1つの態様において、1つまたは複数のプローブは、(i) SEQ ID NO:1に示される配列と相補的である配列、または(ii) SEQ ID NO:2に示される配列と相補的である配列、または(i) もしくは(ii) の断片もしくは変種を含む核酸である。1つの態様において、1つまたは複数のプローブは、(i) SEQ ID NO:5に示される配列と相補的である配列、または(ii) SEQ ID NO:6に示される配列と相補的である配列、または(i) もしくは(ii) の断片もしくは変種を含む核酸である。1つの態様において、核酸プローブは、10から50塩基を含む。1つの態様において、核酸プローブは、30から600塩基を含む。

40

【 0 0 4 7 】

1つの態様において、本方法は、(i) インフルエンザ感染症を有するまたは有することが疑われる患者から血液試料を得る段階；(ii) 血液試料から総RNAの単離体を調製する

50

段階；(iii) 総RNA単離体の逆転写によってcDNAを調製する段階；(iv) ポリメラーゼ連鎖反応によってIFI27核酸配列を増幅する段階；(v) 増幅されたIFI27核酸配列のレベルを標準と比較する段階；(vi) 比較に基づいて患者が臨床的リスクを有するか否かを決定する段階を含む。1つの態様において、ポリメラーゼ連鎖反応は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応である。1つの態様において、標準は、臨床的リスクを示す、または臨床的リスクを示さないIFI27遺伝子産物の標準レベルに基づきうる。

【0048】

1つの態様において、本方法は、IFI27ポリペプチドまたはその断片のレベルを決定する段階を含む。1つの態様において、本方法は、(i) SEQ ID NO:3のアミノ酸配列、または(ii) SEQ ID NO:4のアミノ酸配列を含むIFI27ポリペプチド、または(i) もしくは(ii) の抗原性断片もしくは変種のレベルを決定する段階を含む。1つの態様において、本方法は、SEQ ID NO:3もしくはSEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むIFI27ポリペプチドまたはその抗原性断片もしくは変種に選択的に結合することができる抗体を試料に接触させる段階を含む。

10

【0049】

1つの態様において、本方法は、ゲル電気泳動、核酸シーケンシング、およびアミノ酸シーケンシングの1つまたは複数を含む。

【0050】

1つの態様において、本方法は、完全にエキスピオで行われる。1つの態様において、決定された生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルを標準レベルと比較する段階は、コンピュータープログラムの補助によって行われる。1つの態様において、比較に基づいて患者に臨床的リスクを割付する段階は、コンピュータープログラムの補助によって行われる。

20

【0051】

第二の局面において、IFI27遺伝子産物の存在を検出するための少なくとも1つの物質を含む、生物試料中のインターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子産物のレベルを決定するためのキットが存在する。

【0052】

1つの態様において、少なくとも1つの物質は、プライマー、抗体、またはプローブである。1つの態様において、プライマーまたはプローブは、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6に示される配列から選択される核酸配列、またはその変種もしくは断片に対して特異的である。1つの態様において、キットは、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6に示される配列から選択される核酸配列、またはその変種もしくは断片を選択的に増幅することができるフォワードおよびリバースプライマーを含む。

30

【0053】

1つの態様において、キットは、SEQ ID NO:7 (acctcatcagcagtgaccagt), SEQ ID NO:8 (acatcatcttggtgctgctatgg), SEQ ID NO:9 (TGCCTCGGGCAGCCT) および SEQ ID NO:10 (TTGGTCAATCCGGAGAGTCC)

40

からなる群より選択される1つまたは複数の核酸配列、または同じ標的配列に特異的に結合することができるその配列変種を含む。

【0054】

1つの態様において、キットは、生物試料中のインターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子産物の存在を検出することができる多数の物質を含む。

【0055】

1つの態様において、キットは、IFI27遺伝子配列によってコードされるポリペプチドまたはその断片もしくは変種に特異的に結合することができる抗体を含む。1つの態様において、抗体は、IFI27に特異的なコンジュゲート抗体である。1つの態様において、抗体は、ポリクローナル抗体である。1つの態様において、ポリクローナル抗体は、ウサギポリ

50

クローナル抗体である。1つの態様において、抗体はモノクローナル抗体である。1つの態様において、抗体はエピトープ配列：

MEASALTSSAVTSAKVVVRVASGSAAVVLPLARIATVVIGGVVAVPMVLSAMGFTAAGIASSSI
AAKMMSAAAIANGGGVASGSLVATLQSLGATGLSGLTKFILGSIGSAIAAVIARFY)

に結合する。

【0056】

1つの態様において、抗体は、(i) SEQ ID NO:3に示されるアミノ酸配列を含むIFI27ポリペプチドまたは(ii) SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むIFI27ポリペプチド、または(iii) (i) もしくは(ii) の抗原性断片もしくは変種に選択的に結合することができる。

10

【0057】

1つの態様において、キットは、本方法の正規化のための1つまたは複数の物質を含む。1つの態様において、正規化のための物質は、構成的に発現される遺伝子産物を検出するための1つまたは複数の物質からなる群より選択される。1つの態様において、構成的に発現される遺伝子産物はGAPDHである。

【0058】

1つの態様において、キットは、標準物質が既知濃度のIFI27遺伝子産物を含む、1つまたは複数の校正標準物質を含む。1つの態様において、IFI27遺伝子産物の既知濃度とは、インフルエンザ感染症による重度の疾患の臨床的リスクがごくわずかな個体を示す量であるか、またはインフルエンザ感染症による重度の疾患の臨床的リスクを有する個体を示す量である。

20

【0059】

1つの態様において、校正された標準物質は、ごくわずかな臨床的リスクを示す量、健康な個体の典型である量より約5倍から10倍多くを示す量、健康な個体の典型である量より約10倍から20倍多くを示す量、健康な個体の典型である量より約20倍から40倍多くを示す量、健康な個体の典型である量より約30倍から60倍多くを示す量、健康な個体の典型である量より約50倍から60倍多くを示す量、健康な個体の典型である量より約50倍から100倍多くを示す量、健康な個体の典型である量より約100倍から200倍多くを示す量、健康な個体の典型である量より約150倍から600倍多くを示す量、または健康な個体の典型である量より約500倍から1000倍多くを示す量などの、IFI27遺伝子産物の表記の量の範囲を含む。

30

【0060】

1つの態様において、校正された標準物質は、臨床的リスクを示す量、インフルエンザ感染症を有する個体および臨床的リスクの典型である量より約1倍から2倍多くを示す量、インフルエンザ感染症を有する個体および臨床的リスクの典型である量より約2倍から4倍多くを示す量、インフルエンザ感染症を有する個体および臨床的リスクの典型である量より約3倍から6倍多くを示す量、インフルエンザ感染症を有する個体および臨床的リスクの典型である量より約5倍から10倍多くを示す量、インフルエンザ感染症を有する個体および臨床的リスクの典型である量より約10倍から20倍多くを示す量、などのIFI27遺伝子産物の表記の量の範囲を含む。

40

【0061】

1つの態様において、キットは、(i) 1つまたは複数の参照試料；(ii) 1つまたは複数の検出可能な部分；(iii) 固相支持体上にIFI27遺伝子産物を検出する物質を固定するための1つまたは複数の物体；(iv) 固相支持体材料；(v) 生物試料を採取および/または保存するための1つまたは複数の容器；(vi) 生物試料を調製するために用いられる1つまたは複数の試薬；(vii) 核酸配列を増幅するための1つまたは複数の物質；および(viii) 生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルを決定する方法におけるキットまたはその成分の使用説明書、からなる群より選択される1つまたは複数の追加の成分を含む。

【0062】

50

さらなる局面において、インフルエンザ感染症を有する個体に物質を投与する段階、および個体の生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルを決定する段階、および決定されたIFI27遺伝子産物レベルを標準レベルと比較する段階を含む、インフルエンザを処置するための物質の有効性を評価するための方法が提供される。

【0063】

さらなる局面において、物質を個体に投与する段階、個体の生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルを決定する段階、および決定されたレベルを標準レベルと比較する段階を含む、インフルエンザウイルスに曝露された個体における臨床的リスクを低下させる物質の有効性を評価する方法が提供される。

【0064】

10

1つの態様において、個体は、物質の投与前にインフルエンザウイルスに曝露される。1つの態様において、個体は、物質の投与時にインフルエンザ感染症を有する。1つの態様において、個体は、物質の投与後にインフルエンザウイルスに曝露される。

【0065】

1つの態様において、臨床的リスクを示す標準レベルは、臨床的リスクを定義する標準曲線を含む。1つの態様において、本発明の方法は、ごくわずかである臨床的リスクから重度の疾患の臨床的リスクまでの範囲など、IFI27量の範囲を含む標準曲線の使用を含む。

【0066】

1つの態様において、標準レベルは、IFI27遺伝子産物の1つまたは複数の既知試料を、個体からの生物試料と同じIFI27遺伝子発現レベルの決定法に供することによって調製され、IFI27遺伝子産物の1つまたは複数の既知試料は、臨床的リスクを示すある既定量または複数の既定量の試料である。

20

【0067】

1つの態様において、本方法はさらに、物質を投与する前に個体から得られた生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルを決定する段階を含む。1つの態様において、物質を投与後の個体の生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルが投与前のレベルと比較して低下していれば、インフルエンザウイルスに曝露されたまたはインフルエンザ感染症を有する患者の疾患の重症度を物質が低下させることができることを示している。

【0068】

30

1つの態様において、本方法は、インフルエンザの予防または処置のための候補抗ウイルス剤の研究試験または臨床試験の一部として行われる。

【0069】

略語

略語RSVは、本明細書においてRSウイルスに関して用いられる。

【0070】

略語IFI27は、本明細書においてインターフェロン 誘導タンパク質27に関して用いられる。略語p27もまた、本明細書においてインターフェロン 誘導タンパク質27に関して用いられる。

【0071】

40

略語GAPDHは、本明細書においてグリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼに関して用いられる。

【0072】

略語LPSは、本明細書においてリポ多糖類に関して用いられる。

【0073】

定義

本明細書において用いられる、単数形「1つの」、「1つの(an)」、および「その」は、本文が明らかにそれ以外であることを示している場合を除き、複数形を含む。

【0074】

本文が明らかにそれ以外であることを示している場合を除き、または逆であることを明

50

白に述べている場合を除き、単数の整数、段階、または要素として本明細書において列挙した本発明の整数、段階、または要素は、列挙された整数、段階、または要素の単数形と複数形の両方を明らかに含む。

【0075】

選択された要素の群の文脈において用いる場合の、「少なくとも1つ」という用語は、個々に選択された群の任意のおよび全てのメンバーを含み、および群のメンバーの任意の組み合わせを含む。同様に、選択された要素の群の文脈において用いる場合の「少なくとも2つ」という用語は、任意の組み合わせの群の2つ以上のメンバーの任意の選択を含む。

【0076】

本明細書において用いられる、「含む (comprising)」という用語は、「含むこと (including)」を意味する。「含む (comprise)」および「含む (comprises)」などの「含む」という用語の変化形は、それに対応して変化した意味を有する。このため、たとえばタンパク質をコードする配列を「含む」ポリヌクレオチドは、その配列のみからなりうるか、または1つもしくは複数の追加の配列を含みうる。同様に、1つまたは複数の記載の活性を「含む」方法は、それらの活性のみからなりうるか、または1つもしくは複数の追加の活性を含みうる。同様に、1つまたは複数の記載の要素を「含む」キットは、それらの成分のみからなりうるか、または1つもしくは複数の追加の成分を含みうる。

【0077】

本明細書において用いられる「抗体」および「複数の抗体」という用語は、その最も広い意味で用いられ、IgG (IgG1、IgG2、IgG4、およびIgG4を含む)、IgA (IgA1およびIgA2を含む)、IgD、IgE、またはIgM、およびIgY、一本鎖抗体全体を含む抗体全体、ならびにその抗原結合断片を含む。抗原結合抗体断片は、Fab、Fab'およびF(ab')₂、Fd、一本鎖Fv (scFv)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合Fv (sdFv)、およびVLまたはVHドメインのいずれかを含む断片を含むがこれらに限定されるわけではない。抗体は任意の動物起源の抗体でありうる。一本鎖抗体を含む抗原結合抗体断片は、可変領域のみまたは以下の全てもしくは一部との組み合わせを含みうる：ヒンジ領域、CH1、CH2、およびCH3ドメイン。同様に、可変領域と、ヒンジ領域、CH1、CH2、およびCH3ドメインとの任意の組み合わせも含まれる。抗体は、生物分子に特異的に結合する、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ、多重特異性、ヒト化、およびヒトモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体でありうる。

【0078】

本明細書において用いられる、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、互換的に用いられ、同じ意味を有すると解釈される。

【0079】

本明細書において用いられる、「ヌクレオチド配列」および「ポリヌクレオチド配列」、および「核酸配列」という用語は、互換的に用いられ、同じ意味を有すると解釈される。

【0080】

本明細書において用いられる、「キット」という用語は、材料を送達するための任意の送達システムを意味する。本明細書において記載する検出アッセイおよび方法の文脈において、そのような送達システムは、反応試薬 (たとえば、適当な容器に入れられた標識、参照試料、支持材料等) および/または支持材料 (たとえば、アッセイを行うための緩衝液、書面での説明書等) の1つの場所から別の場所への保存、輸送、または送達を可能にするシステムを含む。たとえば、キットは、関連する反応試薬および/または支持材料を含む、ボックスなどの1つまたは複数の収納容器を含む。

【0081】

本明細書に含まれている文書、行為、材料、装置、商品、またはその他に関するいかなる考察も、単に本発明の文脈を提供する目的のためである。これらの事象の任意または全てが先行技術の基礎の一部を構成すると認めたと解釈してはならず、または本出願の優先権主張日以前に本発明に関連する分野の共通する一般的知識であると認めたと解釈しては

10

20

30

40

50

ならない。

【 0 0 8 2 】

[本発明1001]

インフルエンザ感染症を有するまたは有することが疑われる患者における臨床的リスクを同定するための方法であって、該患者由来の生物試料中のインターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子の発現レベルを決定する段階、および決定されたIFI27遺伝子産物レベルを標準レベルと比較する段階を含む、方法。

[本発明1002]

IFI27遺伝子産物の標準レベルが臨床的リスクなしを示しており、標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27遺伝子産物レベルが、患者における臨床的リスクを示す、本発明1001の方法。

10

[本発明1003]

標準レベルが、健康な対象、インフルエンザに感染した無症候性の対象、またはインフルエンザに感染しているが重度の疾患を発症していない対象におけるIFI27遺伝子産物レベルに基づく、本発明1002の方法。

[本発明1004]

IFI27遺伝子産物の標準レベルが臨床的リスクを示しており、標準レベルと比較して患者の試料中の同等であるかまたは高いIFI27遺伝子産物レベルが、患者における臨床的リスクを示す、本発明1001の方法。

[本発明1005]

20

標準レベルが、健康な対象におけるIFI27遺伝子産物レベルに基づいており、標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27遺伝子産物レベルが、患者における臨床的リスクを示す、本発明1001の方法。

[本発明1006]

標準レベルが、インフルエンザウイルスに感染した無症候性の対象におけるIFI27遺伝子産物レベルに基づいており、標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27遺伝子産物レベルが、患者における臨床的リスクを示す、本発明1001の方法。

[本発明1007]

標準レベルが、患者由来の生物試料中のIFI27遺伝子の発現レベルの決定と同時に調製される、本発明1001～1006のいずれかの方法。

30

[本発明1008]

標準レベルより少なくとも40倍から60倍高いIFI27遺伝子産物レベルが臨床的リスクを示す、本発明1005または1006の方法。

[本発明1009]

標準レベルより少なくとも40倍高いIFI27遺伝子産物レベルが臨床的リスクを示す、本発明1008の方法。

[本発明1010]

標準レベルより少なくとも50倍高いIFI27遺伝子産物レベルが臨床的リスクを示す、本発明1008の方法。

[本発明1011]

40

標準レベルより少なくとも60倍高いIFI27遺伝子産物レベルが臨床的リスクを示す、本発明1008の方法。

[本発明1012]

標準レベルが、IFI27遺伝子産物の1つまたは複数の既知試料を、患者由来の生物試料と同じIFI27遺伝子発現レベルの決定法に供することによって調製され、IFI27遺伝子産物の1つまたは複数の既知試料が、臨床的リスクを示すある既定量または複数の既定量の試料であり、標準レベルと比較して患者の試料中の同等であるかまたは高いIFI27遺伝子産物レベルが、患者における臨床的リスクを示す、本発明1001の方法。

[本発明1013]

標準レベルが、IFI27遺伝子産物の1つまたは複数の既知試料を、患者由来の生物試料と

50

同じIFI27遺伝子発現レベルの決定法に供することによって調製され、IFI27遺伝子産物の1つまたは複数の既知試料が、臨床的リスクなしを示すある既定量または複数の既定量の試料であり、標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27遺伝子産物レベルが、患者における臨床的リスクを示す、本発明1001の方法。

[本発明1014]

患者由来の第一の生物試料中のIFI27遺伝子の発現レベルを決定する段階、および患者由来の第二の生物試料中のIFI27遺伝子の発現レベルを決定する段階であって、第一および第二の試料が異なる時期に患者から得られる、段階、ならびに

第一および第二の試料中のIFI27の相対的発現レベルに基づいて患者の状態を評価する段階

10

を含む、インフルエンザを有する患者の進行をモニターする方法を提供する、本発明1001の方法。

[本発明1015]

第一の生物試料と比較した第二の生物試料中のIFI27遺伝子の発現レベルの増加が、患者における臨床的リスクの増加を示す、本発明1014の方法。

[本発明1016]

第一の生物試料と比較した第二の生物試料中のIFI27遺伝子の発現レベルの低下が、患者における臨床的リスクの低下を示す、本発明1014の方法。

[本発明1017]

患者由来の生物試料中のインターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子の発現レベルを決定する段階、および決定されたIFI27遺伝子産物レベルを標準レベルと比較する段階を含む、患者におけるインフルエンザまたはウイルス性肺炎を同定するための方法。

20

[本発明1018]

標準レベルが、健康な対象におけるIFI27遺伝子産物レベルに基づいており、標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27レベルが、患者におけるインフルエンザまたはウイルス性肺炎を示す、本発明1017の方法。

[本発明1019]

患者がウイルス性肺炎または細菌性肺炎を有することが疑われる、本発明1017の方法。

[本発明1020]

標準レベルが、細菌性肺炎を有する対象におけるIFI27遺伝子産物レベルに基づいており、標準レベルと比較して患者の試料中の高いIFI27遺伝子産物レベルが、インフルエンザまたはウイルス性肺炎を有する患者であることを示す、本発明1017の方法。

30

[本発明1021]

標準レベルより少なくとも10倍高いIFI27遺伝子産物レベルが、インフルエンザまたはウイルス性肺炎を示す、本発明1018～1020のいずれかの方法。

[本発明1022]

標準レベルより少なくとも40倍から60倍高いIFI27遺伝子産物レベルが、インフルエンザまたはウイルス性肺炎および臨床的リスクを有する患者を示す、本発明1018～1020のいずれかの方法。

40

[本発明1023]

標準レベルより少なくとも40倍高いIFI27遺伝子産物レベルが、インフルエンザまたはウイルス性肺炎および臨床的リスクを有する患者を示す、本発明1022の方法。

[本発明1024]

標準レベルより少なくとも50倍高いIFI27遺伝子産物レベルが、インフルエンザまたはウイルス性肺炎および臨床的リスクを有する患者を示す、本発明1022の方法。

[本発明1025]

標準レベルより少なくとも60倍高いIFI27遺伝子産物レベルが、インフルエンザまたはウイルス性肺炎および臨床的リスクを有する患者を示す、本発明1022の方法。

[本発明1026]

50

生物試料中の少なくとも1つの追加の遺伝子の発現レベルを決定する段階をさらに含む、本発明1001～1025のいずれかの方法。

[本発明1027]

少なくとも1つの追加の遺伝子が、その発現が構成的である遺伝子である、本発明1026の方法。

[本発明1028]

少なくとも1つの追加の遺伝子がGAPDH遺伝子である、本発明1027の方法。

[本発明1029]

生物試料が、血液、または血球サブセットなどその成分である、本発明1001～1028のいずれかの方法。

[本発明1030]

生物試料に、IFI27遺伝子産物に結合することができる物質を接触させる段階、および該物質とIFI27遺伝子産物との結合を検出する段階を含む、本発明1001～1029のいずれかの方法。

[本発明1031]

生物試料がRNA、mRNA、cDNA、またはタンパク質である、本発明1001～1030のいずれかの方法。

[本発明1032]

IFI27遺伝子産物が、IFI27 mRNAまたはその断片である、本発明1001～1031のいずれかの方法。

[本発明1033]

IFI27遺伝子産物が、SEQ ID NO:1の核酸配列またはその断片もしくは変種、またはSEQ ID NO:2の核酸配列またはその断片もしくは変種を含む、本発明1001～1032のいずれかの方法。

[本発明1034]

IFI27遺伝子産物が、IFI27ポリペプチドまたはその断片もしくは変種である、本発明1001～1031のいずれかの方法。

[本発明1035]

IFI27遺伝子産物が、SEQ ID NO:3の配列を含むアミノ酸配列またはその断片もしくは変種、またはSEQ ID NO:4の配列を含むアミノ酸配列またはその断片もしくは変種を含む、本発明1034の方法。

[本発明1036]

mRNAのcDNAへの逆転写を含む、本発明1001～1033のいずれかの方法。

[本発明1037]

試料のIFI27核酸配列の増幅および増幅された配列の検出を含む、本発明1001～1033または1036のいずれかの方法。

[本発明1038]

定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）を含む、本発明1001～1033、1036、または1037のいずれかの方法。

[本発明1039]

ポリメラーゼ連鎖反応が、(i) SEQ ID NO:1、(ii) SEQ ID NO:2、(iii) SEQ ID NO:5、(iv) SEQ ID NO:6の配列、および(v) またはSEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6のいずれかの断片または変種から選択される核酸配列を増幅することができる1つまたは複数のプライマーを利用する、本発明1038の方法。

[本発明1040]

ポリメラーゼ連鎖反応が、

SEQ ID NO:7 (acctcatcagcagtgaccagt) および SEQ ID NO:8 (acatcatcttgctgctatgg)

のプライマー配列の1つまたは両方、または同じ標的配列を増幅することができるその配列変種を利用する、本発明1038の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1041]

ポリメラーゼ連鎖反応が、
SEQ ID NO:9 (TGCCTCGGGCAGCCT)および SEQ ID
NO:10 (TTGGTCAATCCGGAGAGTCC)

のプライマー配列の1つまたは両方、または同じ標的配列を増幅することができるその配列変種を利用する、本発明1038の方法。

[本発明1042]

IFI27遺伝子産物またはその断片もしくは変種に特異的に結合することができる1つまたは複数のプローブを試料に接触させる段階を含む、本発明1001または1017の方法。

10

[本発明1043]

1つまたは複数のプローブが、
(i) SEQ ID NO:1に示される配列と相補的である配列、または(ii) SEQ ID NO:2に示される配列と相補的である配列、または(i)もしくは(ii)の断片もしくは変種を含む核酸である、本発明1042の方法。

[本発明1044]

1つまたは複数のプローブが、
(i) SEQ ID NO:5に示される配列と相補的である配列、または(ii) SEQ ID NO:6に示される配列と相補的である配列、または(i)もしくは(ii)の断片もしくは変種を含む核酸である、本発明1042の方法。

20

[本発明1045]

核酸プローブが10から50塩基を含む、本発明1042の方法。

[本発明1046]

核酸プローブが30から600塩基を含む、本発明1042の方法。

[本発明1047]

(i) インフルエンザ感染症を有するまたは有することが疑われる患者から血液試料を得る段階；(ii) 血液試料から総RNA単離体を調製する段階；(iii) 総RNA単離体の逆転写によってcDNAを調製する段階；(iv) ポリメラーゼ連鎖反応によってIFI27核酸配列を増幅する段階；(v) 増幅されたIFI27核酸配列のレベルを標準と比較する段階；(vi) 比較に基づいて該患者が該患者に対する臨床的リスクを有するか否かを決定する段階を含む、本発明1001または1017の方法。

30

[本発明1048]

ポリメラーゼ連鎖反応が定量的ポリメラーゼ連鎖反応である、本発明1047の方法。

[本発明1049]

IFI27ポリペプチドまたはその断片のレベルを決定する段階を含む、本発明1001または1017の方法。

[本発明1050]

(i) SEQ ID NO:3のアミノ酸配列もしくは(ii) SEQ ID NO:4のアミノ酸配列を含むIFI27ポリペプチドまたは(i)もしくは(ii)の抗原性断片もしくは変種のレベルを決定する段階を含む、本発明1049の方法。

40

[本発明1051]

SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むIFI27ポリペプチド、またはその抗原性断片もしくは変種に選択的に結合することができる抗体を試料に接触させる段階を含む、本発明1049の方法。

[本発明1052]

ゲル電気泳動、核酸シーケンシング、およびアミノ酸シーケンシングの1つまたは複数を含む、本発明1001または1017の方法。

[本発明1053]

全体的にエクスピボで行われる、本発明1001または1017の方法。

[本発明1054]

50

生物試料中の決定されたIFI27遺伝子産物レベルを標準レベルと比較する段階が、コンピュータプログラムの補助によって行われる、本発明1001または1017の方法。

[本発明1055]

比較に基づいて患者における臨床的リスクを同定する段階が、コンピュータプログラムの補助によって行われる、本発明1001～1030のいずれかの方法。

[本発明1056]

生物試料中のインターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子産物レベルを決定するためのキットであって、IFI27遺伝子産物の存在を検出するための少なくとも1つの物質を含む、キット。

[本発明1057]

少なくとも1つの物質が、プライマー、抗体、またはプローブである、本発明1056のキット。

[本発明1058]

プライマーまたはプローブが、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6に示される配列から選択される核酸配列、またはその変種もしくは断片に対して特異的である、本発明1056のキット。

[本発明1059]

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6に示される配列から選択される核酸配列またはその変種もしくは断片を選択的に増幅することができるフォワードおよびリバースプライマーを含む、本発明1056のキット。

[本発明1060]

SEQ ID NO:7 (acctcatcagcagtgaccagt), SEQ ID NO:8

(acatcatcttggtgctatgg), SEQ ID NO:9 (TGCCTCGGGCAGCCT) および SEQ ID

NO:10 (TTGGTCAATCCGGAGAGTCC)

からなる群より選択される1つまたは複数の核酸配列、または同じ標的配列に特異的に結合することができるその配列変種を含む、本発明1056のキット。

[本発明1061]

生物試料中のインターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子産物の存在を検出することができる多数の物質を含む、本発明1056のキット。

[本発明1062]

IFI27遺伝子配列によってコードされるポリペプチドまたはその断片もしくは変種に特異的に結合することができる抗体を含む、本発明1056のキット。

[本発明1063]

抗体がIFI27に対して特異的なコンジュゲート抗体である、本発明1062のキット。

[本発明1064]

抗体がポリクローナル抗体である、本発明1062のキット。

[本発明1065]

ポリクローナル抗体がウサギポリクローナル抗体である、本発明1064のキット。

[本発明1066]

抗体がモノクローナル抗体である、本発明1062のキット。

[本発明1067]

抗体が、エピトープ配列：

MEASALTSSAVTSVAKVVRVASGSAAVVLPLARIATVVIGGVVAVPMVLSAMGFTAAGIAS
SSIAAKMMSAAAIANGGGVASGSLVATLQSLGATGLSGLTKFILGSIGSAIAAVIARFY)

に結合する、本発明1062のキット。

[本発明1068]

抗体が、(i) SEQ ID NO:3に示されるアミノ酸配列を含むIFI27ポリペプチド、または(ii) SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むIFI27ポリペプチド、または(iii) (i

10

20

30

40

50

）もしくは（ii）の抗原性断片もしくは変種に選択的に結合することができる、本発明1062のキット。

[本発明1069]

前記方法の正規化のための1つまたは複数の物質を含む、本発明1056のキット。

[本発明1070]

正規化のための物質が、構成的に発現される遺伝子産物を検出するための1つまたは複数の物質からなる群より選択される、本発明1056のキット。

[本発明1071]

構成的に発現される遺伝子産物がGAPDHである、本発明1056のキット。

[本発明1072]

前記キットが1つまたは複数の校正された標準を含み、該標準がIFI27遺伝子産物の既知濃度を含む、本発明1056のキット。

[本発明1073]

（i）1つまたは複数の参照試料；（ii）1つまたは複数の検出可能な部分；（iii）固相支持体上にIFI27遺伝子産物を検出するための物質を固定するための1つまたは複数の物体；（iv）固相支持体材料；（v）生物試料を採取および／または保存するための1つまたは複数の容器；（vi）生物試料の調製に用いるための1つまたは複数の試薬；（vii）核酸配列を増幅するための1つまたは複数の物質；ならびに（viii）生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルを決定するための方法におけるキットまたはその成分の使用説明書からなる群より選択される1つまたは複数の追加の成分を含む、本発明1056のキット。

[本発明1074]

インフルエンザを処置するための物質の有効性を評価するための方法であって、インフルエンザ感染症を有する個体に該物質を投与する段階、および該個体由来の生物試料中のインターフェロン誘導タンパク質27（IFI27）遺伝子産物レベルを決定する段階、および決定されたIFI27遺伝子産物レベルを標準レベルと比較する段階を含む、方法。

[本発明1075]

インフルエンザウイルスに曝露された個体における疾患の重症度を低下させるための物質の有効性を評価するための方法であって、

該物質を該個体に投与する段階、該個体由来の生物試料中のインターフェロン誘導タンパク質27（IFI27）遺伝子産物レベルを決定する段階、および決定されたレベルを標準レベルと比較する段階を含む、方法。

[本発明1076]

個体が、前記物質の投与前にインフルエンザウイルスに曝露される、本発明1074または1075の方法。

[本発明1077]

個体が、前記物質の投与時にインフルエンザ感染症を有している、本発明1074または1075の方法。

[本発明1078]

個体が、前記物質の投与後にインフルエンザウイルスに曝露される、本発明1074または1075の方法。

[本発明1079]

前記物質を投与する前の個体から得られた生物試料中のIFI27遺伝子産物のレベルを決定する段階をさらに含む、本発明1074または1075の方法。

[本発明1080]

投与前のレベルと比較して前記物質の投与後の個体由来の生物試料中の低いIFI27遺伝子産物レベルが、インフルエンザウイルスに曝露されたまたはインフルエンザ感染症を有する患者における疾患の重症度を前記物質が低下させることができることを示す、本発明1074または1075の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1081]

インフルエンザの予防または処置のために候補抗ウイルス剤の研究試験または臨床試験の一部として行われる、本発明1074または1075の方法。

記載の目的に関して、本明細書において言及した全ての文書は、それ以外であると明記している場合を除き、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】**【0083】**

本発明の好ましい態様を、添付の図面を参照して、例によって以下に記述する。

【図1】ゲノムワイドマイクロアレイ分析を用いた候補遺伝子のスクリーニングを示す。末梢血を、確認されたインフルエンザ感染症を有する個体から採取した。プローブ48,804個をカバーするマイクロアレイ分析 (Illumina Sentrix HT- 12_v3_BeadChipアレイ) のためにRNAを抽出した。遺伝子発現シグナルは、各々の軸において発現強度のlog2によって表した。対角線は、2群 (H1N1インフルエンザ対健康な対照) を比較した場合の発現の変化がないことを表す。対角線より上の線は、遺伝子アップレギュレーションの少なくとも2倍増加を表す。対角線より下の線は、遺伝子ダウンレギュレーションの少なくとも2倍増加を表す。各ドットは、マイクロアレイ上の個々のプローブを示す。IFI27は、誘導タンパク質27 (IFI27プローブを赤色で強調した) を示す。

【図2】重度のインフルエンザ感染症におけるIFI27発現を示す。実験セット (n=8) およびバリデーションセット (n=33) は、呼吸不全を発症して集中治療室への入院を必要とする重度のインフルエンザ肺炎を有する個体からなる。対照セット (n=18) は、健康なボランティアからなる。末梢血のIFI27遺伝子発現をPCRによって測定した。棒グラフは、平均変化倍率 \pm SDを示す。p値を、ノンパラメトリックマン・ホイットニーU検定を用いて計算した。

【図3】インフルエンザ感染症のIFI27発現および重症度を示す。軽度の疾患および重度の疾患を有する個体における独立したデータセットを用いたバイオマーカーのバリデーション。軽度の感染症コホートは、無症候性 (n=8) および症候性の個体 (n=9) を含む。重度の感染症コホート (n=10) は、呼吸不全を発症して集中治療室への入院を必要とした個体を含む。Gene Expression Omnibus (GEO) は、IFI27発現を計算するためのマイクロアレイデータセットを提供する (GSE17156-軽度のインフルエンザ、GSE21802-重度のインフルエンザ)。棒グラフは、平均変化倍率 \pm SDを示す。p値を、ノンパラメトリックマン・ホイットニーU検定を用いて計算した。

【図4】実験セットにおけるインフルエンザ感染症からの回復時のIFI27発現を示す。実験セット (n=8) におけるインフルエンザ感染症による重度の疾患を有する患者を5日間追跡して、末梢血IFI27発現を、1日目、3日目、および5日目に定量的PCRによって測定した。棒グラフは平均変化倍率 \pm SDを示す。

【図5】バリデーションセットにおけるインフルエンザ感染症からの回復時のIFI27発現を示す。バリデーションセット (n=33) におけるインフルエンザ感染症による重度の疾患を有する患者を5日間追跡して、末梢血IFI27発現を、1日目、3日目、および5日目に定量的PCRによって測定した。棒グラフは平均変化倍率 \pm SDを示す。

【図6】インフルエンザ感染症による軽度および重度の疾患におけるインターフェロン誘導遺伝子を示す。暗色の棒グラフは、インフルエンザ感染症による軽度の疾患における遺伝子発現を示す。明色の棒グラフは、インフルエンザ感染症による重度の疾患における遺伝子発現を示す。

【図7】IFI27発現および増加するウイルス量を示す。健康なボランティアから単離した末梢血単核球を、インフルエンザウイルス (H1N1 2009) と共に培養した。IFI27発現を、ウイルス量の各濃度に関して定量的PCRによって測定した (MOIは感染多重度を示し、ウイルス対総細胞の比率を表す)。棒グラフは平均変化倍率 \pm SDを示し、異なる3人の対象からの独立した実験を表す。SEQ ID NO:1

【図8】IFI27発現および抗ウイルス剤を示す。健康なボランティアから単離した末梢血単核球 (PBMC) をインフルエンザウイルス (H1N1 2009) と共に培養した後、抗ウイルス

10

20

30

40

50

剤（オセルタミビル）によって処置した。オセルタミビルHは高濃度（37 ng/μl）を表し、オセルタミビルLは低濃度（0.3 ng/μl）を表す。定量的PCRを介してIFI27発現を測定した。棒グラフは平均変化倍率±SDを示し、異なる3人の対象からの独立した実験を表す。

【図9】IFI27発現およびインターフェロン経路の活性化因子を示す。末梢血単核球をIFN- α 、IFN- β 、およびIFN- γ によって刺激した後、IFI27発現をPCRによって測定した。棒グラフは平均変化倍率±SDを示す。

【図10】IFI27発現およびインターフェロン γ を示す。健康なボランティアから単離した末梢血単核球を、異なる濃度のインターフェロン γ （IFN γ ）と共に培養した。定量的PCRを介してIFI27発現を測定した。棒グラフは平均変化倍率±SDを示し、異なる3人の対象からの独立した実験を表す。

【図11】IFI27発現およびtoll様受容体リガンドを示す。健康なボランティアから単離した末梢血単核球を、toll様受容体に対するリガンドと共に培養した。IFI27発現を、各リガンドに関して定量的PCRを介して測定した。異なる対象に関して独立した実験を、TLR1、TLR2、TLR3、TLR5、TLR6、TLR8、TLR9（n=2）、TLR4（n=4）、TLR7（n=10）を含む各toll様受容体（TLR）リガンドに関して行った。棒グラフは平均変化倍率±SDを示す。p値は、多群比較のためのクラスカル・ウォリス検定を用いて計算した。

【図12】toll様受容体7上のリガンドによる刺激後の異なる免疫細胞サブセットにおけるIFI27発現を示す。ガーディキモド（TLR7リガンド）による刺激後、IFI27発現を、CD4、CD8、好中球、B細胞、単球、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、骨髄樹状細胞（mDC）、形質細胞様樹状細胞（pDC）、単球由来マクロファージ（MDM）、および単球由来樹状細胞（MDDC）を含む各免疫細胞サブセットにおいて定量的PCRを介して測定した。PBMCは、末梢血単核球を示す。棒グラフは平均変化倍率±SDを示す。p値は、多群比較のためのクラスカル・ウォリス検定を用いて計算した。

【図13】IFI27発現およびウイルス抗原を示す。IFI27発現を、ウイルス抗原による刺激によって定量的PCRを介して測定した。免疫細胞サブセットは、CD4、CD8、好中球、B細胞、単球、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、骨髄樹状細胞（mDC）、形質細胞様樹状細胞（pDC）、単球由来マクロファージ（MDM）、および単球由来樹状細胞（MDDC）を含む。PBMCは、末梢血単核球を示す。棒グラフは平均変化倍率±SDを示す。

【図14】形質細胞様樹状細胞およびインフルエンザウイルスにおけるIFI27発現を示す。形質細胞様樹状細胞を、H1N1（カリフォルニア-2009）、H3N2（ビクトリア-2011）を含むA型インフルエンザウイルス、およびB型インフルエンザウイルスと共に培養した。IFI27遺伝子発現を定量的PCRによって測定した。棒グラフは平均変化倍率±SDを示す。各データポイントは、異なる2人の対象からの独立した実験を表す。

【図15】IFI27遺伝子発現に関して提唱されるメカニズムを示す。pDCは、形質細胞様樹状細胞を示す。TLR7は、toll様受容体7を示す。IFN γ は、インターフェロン γ を示す。MyD88は、骨髄細胞分化初期応答遺伝子を示す。IRF7はインターフェロン調節因子7を示す。

【図16】形質細胞様樹状細胞（pDC）におけるIFI27発現の経時的変化を示す。インフルエンザウイルスを形質細胞様樹状細胞と共に培養した。IFI27遺伝子発現を定量的PCRによって毎日測定した。アポトーシス細胞を、フローサイトメトリーによってゲートを設定して、アネキシンVおよびヨウ化プロピジウム両方が陽性である細胞（アネキシンV陽性、PI陽性）として同定した。棒グラフは平均変化倍率±SDを示す。

【図17】細菌およびウイルス病原体に応答したIFI27発現を示す。ウイルス（H1N1インフルエンザウイルス）および細菌刺激（LPSはリポ多糖類を示す）による刺激後、定量的PCRを介してIFI27発現を測定した。棒グラフは平均変化倍率±SDを示す。

【図18】異なる疾患状態におけるIFI27遺伝子発現を示す。SIRSは全身性炎症反応症候群を示す。末梢血IFI27遺伝子発現を、インフルエンザ肺炎（n=8）、細菌性肺炎（n=16）、SIRS（n=12）を有する個体、および健康な対照（n=18）において定量的PCRによって測定した。棒グラフは平均変化倍率±SDを示す。p値を、ノンパラメトリックマン・ホイットニーU検定を用いて計算した。

10

20

30

40

50

【図 19】細菌性肺炎およびインフルエンザ肺炎におけるIFI27発現を示す。IFI27発現を、重度のインフルエンザ肺炎 (n=8) および細菌性肺炎 (n=16) を有する患者の2つのコホートにおいて定量的PCRを介して測定した。棒グラフは平均変化倍率±SDを示す。

【図 20】外傷および手術患者におけるIFI27発現を示す。

【図 21】外傷患者の大きいコホートにおけるIFI27発現を示す。外傷患者 (n=167) の独立したコホートを用いるバイオマーカーのバリデーション。Gene Expression Omnibus (GEO) は、IFI27発現 (GSE11375) を計算するためのマイクロアレイデータを提供する。遺伝子発現データを、28日にわたって記録した。各データポイントは、個々の患者の遺伝子発現レベルを表す。

【図 22】IFI27 mRNA配列、アイソフォーム1のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO:1) を示す。ヒトインターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) mRNA。NCBI参照配列: NM_001130080.1。プライマーアニーリング部位 (SEQ ID NO.: 7およびSEQ ID NO.:8) を強調して下線で示す。

10

【図 23】IFI27 mRNA配列、アイソフォーム2のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO:2) を示す。プライマーアニーリング部位 (SEQ ID NO.: 7およびSEQ ID NO.:8) を強調して下線で示す。

【図 24】IFI27、アイソフォーム1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:3) を示す。インターフェロン 誘導タンパク質27[ヒト]。NCBI参照配列: NP_001123552.1。

【図 25】IFI27、アイソフォーム2のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:4) を示す。

【図 26】本明細書の実施例におけるIFI27の標的領域を示す。uc021sba.1_IFI27を参照したヌクレオチド配列の位置。プライマーアニーリング部位 (SEQ ID NO.: 7およびSEQ ID NO.:8) を強調して下線で示す。

20

【図 27 - 1】本明細書の実施例におけるGAPDHの標的領域を示す。uc001qop.1_GAPDH (SEQ ID NO.: 13) を参照することによって増幅したヌクレオチド配列。エキソンを大文字のフォントで示す。プライマーアニーリング部位 (SEQ ID NO.: 14およびSEQ ID NO.: 15) を強調して下線で示す。

【図 27 - 2】本明細書の実施例におけるGAPDHの標的領域を示す。uc001qop.1_GAPDH (SEQ ID NO.: 13) を参照することによって増幅したヌクレオチド配列。エキソンを大文字のフォントで示す。プライマーアニーリング部位 (SEQ ID NO.: 14およびSEQ ID NO.: 15) を強調して下線で示す。

30

【図 28】ヒトグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、転写物変種1、mRNAのヌクレオチド配列を示す。NCBI参照配列: NM_002046.4 (SEQ ID NO.: 12)。プライマーアニーリング部位 (SEQ ID NO.:14およびSEQ ID NO.:15) を強調して下線で示す。

【図 29】ヒトグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 転写物変種2、mRNAのヌクレオチド配列を示す。NCBI参照配列: NM_001256799.1 (SEQ ID NO.: 18)。プライマーアニーリング部位 (SEQ ID NO.:14およびSEQ ID NO.:15) を強調して下線で示す。

【発明を実施するための形態】

【0084】

40

本明細書において参照される配列

SEQ ID NO:1: IFI27 mRNA配列、アイソフォーム1; 665塩基; NM_001130080.1から。

【0085】

SEQ ID NO:2: IFI27 mRNA配列、アイソフォーム2、656塩基。

【0086】

SEQ ID NO:3: IFI27ポリペプチドアミノ酸配列、アイソフォーム1: NP_001123552.1から。

【0087】

SEQ ID NO:4: IFI27ポリペプチドアミノ酸配列、アイソフォーム2。

【0088】

50

SEQ ID NO:5 : IF127 cDNA配列、アイソフォーム1 : NM_001130080.1のアイソフォーム1 mRNA (SEQ ID NO:1) から合成される。

【 0 0 8 9 】

SEQ ID NO:6 : IF127 cDNA配列、アイソフォーム2 mRNA (SEQ ID NO:2) から合成される。

【 0 0 9 0 】

SEQ ID NO:7 :
acctcatcagcagtgaccagt
(IF127フォワードプライマー-59.8C)。

【 0 0 9 1 】

SEQ ID NO:8 :
acatcatcttggctgctatgg
(IF127リバースプライマー-60.1 C)。

【 0 0 9 2 】

SEQ ID NO:9 :
TGCCTCGGGCAGCCT
(IF127フォワードプライマー)。

【 0 0 9 3 】

SEQ ID NO: 10 :
TTGGTCAATCCGGAGAGTCC
(IF127リバースプライマー)。

【 0 0 9 4 】

SEQ ID NO:11 : 本明細書の実施例に関するIF127標的核酸配列。UCSC Genesからの配列および座標、uc021sba.1_IF127、位置142-328。187 bp標的領域。

【 0 0 9 5 】

SEQ ID NO: 12 : GAPDH完全長mRNA配列 ; 転写物変種1、mRNA : NCBI参照配列 : NM_002046.4。

【 0 0 9 6 】

SEQ ID NO: 18 : GAPDH完全長mRNA配列 : 転写物変種2、mRNA ; NCBI参照配列 : NM_001256799.1。

【 0 0 9 7 】

SEQ ID NO: 13 : 本明細書の実施例に関するGAPDH標的核酸配列。 UCSC Genesからの配列および座標、uc001qop.1_GAPDH。

【 0 0 9 8 】

SEQ ID NO:14 :
ACGCATTTGGTCGTATTGGG
(GAPDHフォワードプライマー)。

【 0 0 9 9 】

SEQ ID NO: 15 :
TGATTTTGGAGGGATCTCGC
(GAPDHリバースプライマー)。

【 0 1 0 0 】

SEQ ID NO: 16 :
cag gaa ttc atA TGG AGG CCT CTG CTC TCA

(Gjermandsen et al, 1999 (ISG12f;) のIF127フォワードプライマー)。

【 0 1 0 1 】

SEQ ID NO: 17 :
cgc gaa ttc agC TAG TAG AAC CTC GCA ATG

10

20

30

40

50

(Gjermansen et al, 1999 (ISG12r;)のIFI27リバースプライマー)。

【0102】

詳細な説明

本発明は、少なくとも部分的に、対象におけるIFI27の発現レベルがその対象におけるインフルエンザ感染症によって引き起こされる疾患の重症度と関連することを本発明者が同定したことに基づいている。本発明は、重篤な疾患を発症する可能性がより高く、入院または臨床環境での医学的介入を必要とすることとして定義される臨床的リスクを、どの個体が有するかを決定することによって、インフルエンザに感染した患者を評価するために用いられうる。この決定は、患者がインフルエンザ感染症の症状を示す前に、および患者が重度の疾患を示す症状を示す前になされうる。医学的介入は、入院または生命維持治療を含みうるがこれらに限定されるわけではない。本発明は、医療において、たとえばインフルエンザ感染症の初期の管理、疾患に対する患者の免疫応答のモニタリング、およびそうでなければ従来の診断アプローチでは見逃されうる有リスク者に対する生命維持介入を可能にすることにおいて応用を有する。

10

【0103】

本発明の1つの局面において、患者の生物試料中のインターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子の発現レベルを決定する段階、および決定されたIFI27遺伝子産物レベルを標準レベルと比較する段階を含む、インフルエンザ感染症を有するまたは有することが疑われる患者における臨床的リスクを同定する方法が提供される。IFI27遺伝子産物の標準レベルは、臨床的リスクを示すまたは臨床的リスクを示さないレベルでありうる。

20

【0104】

患者におけるIFI27遺伝子産物レベルを標準レベルと比較する場合、患者におけるIFI27遺伝子産物レベルの上昇は、標準レベルに対する増加倍率として表記されうる。本発明の1つの局面において、健康な対象またはインフルエンザを有する無症候性の対象の典型であるIFI27遺伝子産物レベルの少なくとも40倍から60倍である患者のIFI27遺伝子産物レベルは、臨床的リスクを示している。本発明の別の局面において、健康な対象またはインフルエンザを有する無症候性の対象の典型であるIFI27遺伝子産物レベルの少なくとも40倍である患者のIFI27遺伝子産物レベルは、臨床的リスクを示している。さらなる局面において、健康な対象またはインフルエンザを有する無症候性の対象の典型であるIFI27遺伝子産物レベルの少なくとも50倍である患者のIFI27遺伝子産物レベルは、臨床的リスクを示している。本発明のなお別の局面において、健康な対象またはインフルエンザを有する無症候性の対象の典型であるIFI27遺伝子産物レベルの少なくとも60倍である患者のIFI27遺伝子産物レベルは、臨床的リスクを示している。

30

【0105】

本発明の別の局面において、インフルエンザ感染症を有するまたは有することが疑われる患者における臨床的リスクを同定するための診断法を作製するための、生物試料中のIFI27遺伝子産物を検出することができる物質の使用が提供される。

【0106】

本発明の別の局面において、インフルエンザ感染症を有するまたは有することが疑われる患者における臨床的リスクを同定する方法において用いるための、生物試料中のIFI27遺伝子産物を検出することができる物質が提供される。

40

【0107】

たとえば生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルを決定する段階は、本明細書において代わりに、たとえば生物試料中のIFI27遺伝子の発現レベルを決定する段階と呼ばれうる。ゆえに、IFI27遺伝子産物の発現レベルを決定する段階は、「レベル」が、IFI27タンパク質またはその断片などの、任意のIFI27転写物または下流の産物を含みうるように、その最も広い意味を意味する。

【0108】

インターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子産物は、核酸、たとえばRNA転写物、そのような転写物のcDNA誘導体、およびその他、タンパク質およびポリペプチドを含

50

むがこれらに限定されるわけではない任意の適切な遺伝子産物でありうる。典型的に、遺伝子産物は、mRNAまたはその断片、またはポリペプチド、タンパク質、またはその断片である。

【0109】

特に流行（たとえば、毎年の季節性インフルエンザ）またはパンデミック（たとえば、H1N1 2009インフルエンザウイルス）の際には、疾患の流行および重症度を軽減する要因を有効に管理する能力が低下するかまたは利用できないことから、本発明は、感染疾患の有病率、死亡率、ならびに社会および経済的費用を悪化させる感染疾患医学におけるリスク階層化ツールの欠如に取り組む。そのような軽減因子は、（１）疾患の流行を制御するために、検疫を必要とする患者；（２）疾患の重症度および感染症の期間を減少させるために、悪化しやすい患者；ならびに（３）高リスクまたは難しい症例を早期に中和するために、同時罹患率に対する患者の素因、の決定および優先順位決定を含む。

10

【0110】

本明細書において記述されるIFI27バイオマーカーによるリスク階層化は、入院の遅れを最小限にして、それゆえおそらく生命を救う。患者が感染症または重度の疾患の症状を有する前に使用することができるインフルエンザ感染症のためのリスク階層化ツールを提供することによって、高リスク患者を、早期に同定することができ、それによってこれらの患者に対して適切な医療を確実に迅速に送達することができる。

【0111】

本発明の方法によって、医師はまた、インフルエンザを有する患者の進行をモニターすることができる。これによって、医師は、疾患の比較的軽度の症状発現から臨床的リスクへの起こりうる悪化に関して患者をモニターすることができるか、または臨床的リスク状態から回復への患者の改善をモニターすることができる。

20

【0112】

典型的に、このタイプのモニタリングは、本発明の方法において、患者の第一の生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルを決定する段階、および患者の第二の生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルを決定する段階によって行われ、第一および第二の試料は、異なる時間で患者から得られる。たとえば、第一の試料は、処置を開始する前に得てもよく、および第二の試料は、患者が処置または観察を受けている所定の期間後に得てもよい。

【0113】

当然、必要に応じて患者をさらにモニターするために、任意の数のその後の試料が用いられうる。試料は、1時間または数時間、または毎日、または毎週の間隔などの適切な間隔で患者から得てもよい。試料は、インフルエンザ感染症による疾患の原因を処置するための治療物質の投与などの、ある処置が行われた後に得てもよい。

30

【0114】

このようにして、第一の生物試料と比較して第二の（またはその後の）生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルが増加していれば、患者の臨床的リスクの増加を示すが、低下していれば、臨床的リスクの低下を示す。臨床的リスクの増加は、患者が医学的介入を必要とするまたは必要とし続ける見込みの増加として定義されうるが、臨床的リスクの低下は、患者が医学的介入を必要とするまたは必要とし続ける見込みの減少である。そのようなモニタリングの結果に応じて、医師は、患者の処置を調節してもよい。このように本方法は、患者の処置および管理において医師を補助する。

40

【0115】

本発明者らはまた、IFI27の発現の上昇が、インフルエンザ感染症に対して特異的であり、細菌感染症では増加しないことを、インビトロ試験を通して証明している。その結果、本発明はまた、インフルエンザおよびウイルス性肺炎などの関連疾患を有する患者を、細菌性肺炎などの類似の症状を示しうる他の状態を有する患者と区別する方法も提供する。このように区別できることは、多くの環境で処置を行う医師にとって有利であり、インフルエンザと細菌感染症の両方を示しうる症状を有しうる患者の過剰管理を回避するのに補助しうる。その結果、本発明は、階層化診断よりむしろ、予防的抗生物質によるインフ

50

ルエンザ患者の「過剰処置」などの、特に一般診療レベルでのインフルエンザ感染症の管理の典型である1つまたは複数の問題を緩和しうる。この実践は大規模に行われていることから、抗生物質耐性細菌が出現している。本発明は、それによってそれぞれ、しばしば悪化させて死亡を引き起こす大規模の不必要な有病率、または耐性細菌の発生を促進する抗生物質の過剰処方に至る、疾患の著しい過少管理または過剰管理の状況を緩和する。

【0116】

別のシナリオにおいて、患者は、ウイルス性肺炎により最初入院しうる。患者はその後、細菌性肺炎などの合併症を発症しうる。医師は、(1)ウイルス性肺炎が持続する、または(2)細菌感染症を併発しているために、患者が快方に向かっているか否かを知る必要がある。本発明は、患者の生物試料の分析によって決定した場合に、ウイルス性肺炎が持続すれば、および/または臨床的に有意なインフルエンザが持続すれば、患者において上昇しているが、患者がその代わりに細菌感染症を有する場合は、基礎レベルであるかまたはほぼ基礎レベルであるIFI27遺伝子産物の発現に基づいて、両者を識別できることを提供する。

10

【0117】

さらなるシナリオは、第一にそれが細菌性であるかまたはウイルス性の肺炎であるかを医師が確信を持って診断できない非定型のまたは異常な症状により、患者が救急部門を最初に訪れる場合である。これは、より一般的な臨床での苦しい選択であり、これまで、従来の試験は、この問題を解決するために有用ではなかった。予防的手段として、そのような患者はしばしば抗生物質によって処置されるであろう。患者の生物試料中で決定されるIFI27発現が上昇すると予想されるウイルス性肺炎を有する患者と、IFI27発現レベルが上昇しないと予想される細菌性肺炎のみを有する患者との識別能を提供することにより、本発明は、医師に、改善された診断ツールを提供して、それによって、臨床的に適切な処置をより早期に開始することができる。

20

【0118】

別の局面において、本発明は、このように、患者の生物試料中のIFI27遺伝子の発現レベルを決定する段階、および決定されたIFI27遺伝子産物レベルを標準レベルと比較する段階を含む、患者におけるインフルエンザまたはウイルス性肺炎を同定する方法を提供する。標準レベルは、健康な患者または細菌性肺炎を有する患者におけるIFI27遺伝子産物レベルに基づいてもよく、患者における高いIFI27遺伝子産物レベルが、インフルエンザまたはウイルス性肺炎を有する患者であることを示す。

30

【0119】

本発明の1つの局面において、標準レベルより少なくとも10倍高い患者の生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルは、インフルエンザまたはウイルス性肺炎を示す。

【0120】

本発明の別の局面において、患者におけるインフルエンザまたはウイルス性肺炎を同定するための診断法を作製するための、生物試料中のIFI27遺伝子産物を検出することができる物質の使用が提供される。

【0121】

本発明の別の局面において、患者におけるインフルエンザまたはウイルス性肺炎を同定する方法において用いるための、生物試料中のIFI27遺伝子産物を検出することができる物質が提供される。

40

【0122】

本発明の別の局面において、生物試料中のIFI27遺伝子産物を検出することができる少なくとも1つの物質を含む、患者におけるインフルエンザまたはウイルス性肺炎を同定する方法において用いるためのキットが提供される。

【0123】

IFI27発現がインフルエンザ感染症によって引き起こされる疾患の重症度と関連することが本発明者らによって同定されたことはまた、インフルエンザの処置または予防において有用でありうる物質の試験および物質に関する試験においても有用性を有する。これは

50

、たとえばインフルエンザウイルスに曝露された対象における疾患の重症度を低下させることができる物質でありうる。抗ウイルス（インフルエンザウイルス）は、主要な研究領域であり、可能性はあるまたは推定の抗ウイルス剤または物質の有効性を調べるための臨床試験が行われている。典型的に、これらの治験は、心拍数、血中酸素レベル、血圧、死亡率（死亡率）等などの臨床パラメータを用いる。これらのパラメータには有意な限界がある。これは、それらが疾患の重症度（たとえば、心拍数および血圧は、感染症の重症度に関して非特異的である）を測定していないためである。加えて、死亡などの事象は、インフルエンザ感染症においてまれな事象である。このことは、処置群と対照群との差を検出するための適切な統計力を有するためには、臨床試験が、何千人もの患者を募集する必要があることを意味する。臨床試験における限界を克服するまたは改善するための代替策は、代用マーカーを用いることである。理想的には、代用マーカーは、疾患の生物活性を反映して、処置の効果と相関する（すなわち、そのレベルは処置の成功と共に低下する）。本明細書において証明されるように、IFI27は、そのような代用マーカーである可能性を有する。IFI27は、抗ウイルス剤の臨床試験の際に処置応答をモニターするために役立つ。

10

【0124】

インターフェロン 誘導タンパク質27（IFI27）

IFI27は、未知機能の低分子インターフェロン 誘導遺伝子ファミリーの1つのメンバーである。IFI27は、またはインターフェロン 誘導11.5 kDaタンパク質、インターフェロン刺激遺伝子12aタンパク質として、および代わりの略語ISG12、ISG12(a)、FAM14D、およびP27としても知られる。IFI27のcDNAは、当初、ヒト上皮細胞株MCF-7においてエストロゲン誘導遺伝子としてクローニングされ、p27と命名された³。IFI27は、乾癬表皮病巣における病巣性および非病巣性乾癬皮膚においてアップレギュレートされ⁴、ならびに定量的RT-PCR試験において非病巣性ケラチノサイトにおいて検出可能である⁵と報告されている。同じ試験により、扁平苔癬、慢性湿疹、皮膚扁平上皮癌などの他の皮膚疾患においても発現されることが報告され、ケラチノサイトをIFN-、TNF-、またはTGF-1によって刺激すると発現のアップレギュレーションを示した。その結果、IFI27は、上皮増殖および癌のマーカーであると仮定されている。IFI27はまた、変形性関節炎およびリウマチ性関節炎の滑膜組織と比較して全身性紅斑性狼瘡の滑膜組織において有意に過剰発現されていると報告されている⁶。

20

30

【0125】

本出願は、インフルエンザを有する対象において、IFI27の発現レベルの増加と臨床的リスクとのあいだに相関があるという記述を初めて提供する。

【0126】

ヒトIFI27遺伝子は、長さが11,852 bpであり、14q32に位置する。異なるタンパク質アイソフォームを生じるスプライス変種が報告されている⁷。IFI27には、アイソフォーム1（665ヌクレオチド）、およびアイソフォーム2（656ヌクレオチド）と呼ばれる2つの公知の転写物変種が存在する。NM_001130080.1は、アイソフォーム1のNCBI参照配列である（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001130080.1を参照されたい）。この変種は、ヒト集団において一般的に見いだされる対立遺伝子を表す。完全なポリペプチド配列は、アミノ酸119個である（<http://www.uniprot.org/uniprot/P40305>）。NM_005532.3はアイソフォーム2のNCBI参照配列である（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_005532.3を参照されたい）。この変種（2）は、変種1と比較してCDSにおける9ヌクレオチドのセグメントを欠如する代替対立遺伝子を表す。得られたアイソフォーム（2）は、アイソフォーム1と比較して、内部のアミノ酸3個のセグメントを欠如して2つの近接するアミノ酸が異なる。この変種は、ヒト集団において一般的に見いだされる第二の対立遺伝子を表す。IFI27ポリペプチドは、またはインターフェロン 誘導11.5 kDaタンパク質としても知られる。

40

【0127】

IFI27の発現は、たとえばRT-PCR^{5,6,8}およびノザン分析⁵によるヌクレオチドレベルで

50

の試験を主に利用する様々な報告において調べられている。IFI27遺伝子産物の発現はまた、たとえばイムノアッセイまたはウェスタンブロッティングを利用したIFI27ポリペプチドレベルの検出および/または定量的分析に基づいても報告されている⁶。前述の刊行物に記述されるIFI27遺伝子産物の発現の検出および/または定量方法は、本発明の方法を行うために適切であり、そこに記述される方法および物質は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0128】

患者

本発明の方法は、IFI遺伝子産物の存在および定量に関する患者の試料の分析を含む。このようにして、試料中のIFI27遺伝子産物レベルを定量してもよく、それによって患者における臨床的リスクを同定することができる。同様に、本発明の方法は、細菌性肺炎などの類似の臨床症状を有しうる状態とは異なるインフルエンザまたはウイルス性肺炎の存在に関して患者を評価することができる。

10

【0129】

本明細書において、「患者」という用語の使用は広い意味を有すると意図されると理解されるであろう。患者は、本方法が行われる任意の個体である。典型的に、患者は、インフルエンザ感染症を有するまたは有することが疑われる個体である。非制限的な例として、患者は入院中の個体、外来診療または救急治療により病院を訪れた個体、医師の診療所または外科医もしくは内科医の診察室または任意の保健評価施設もしくは保健検査施設を訪れた個体でありうる。患者は、インフルエンザ感染症の1つまたは複数の症状を有するまたは有しない集団のメンバーである個体でありうる。患者は、インフルエンザ感染症により重度の疾患をおそらく発症する「リスクがある」と見なされる群または集団のメンバー、たとえば高齢者、慢性疾患を有する、免疫無防備状態、インフルエンザウイルスによる重度の疾患の既往を有する個体、インフルエンザ様症状の既往を有する個体でありうる。そのような群または集団のメンバーは、インフルエンザ大発生、パンデミック、または流行の際などに、広い保健目的の一部としてスクリーニングに供されうる。

20

【0130】

生物試料

態様において、本発明の方法は、患者から生物試料を得る段階を含む。生物試料は典型的に、血液試料である。生物試料は、血球サブセット、タンパク質分画、または総RNAもしくはmRNAなどの核酸分画などの、選択された血液成分でありうる。生物試料は、白血球などの1つもしくは複数の成分、またはpDCなどのその特異的成分の存在に関して分画または濃縮するために処理されうる。

30

【0131】

患者から血液試料などの生物試料を得る段階は、本発明の方法の実行における一連の連続した段階の一部として行われうる。患者から血液試料を得る段階は、本発明の方法の1つまたは複数の残りの段階とは異なる、たとえば時間、場所、またはオペレーターが異なる個別の段階または複数の段階として行われてもよい。したがって、本発明の方法の実行において、血液試料を得る段階は、患者から血液を採取する段階を伴ってもよくまたは伴わなくてもよい。本発明の方法の実行は、たとえば、本発明の方法の実行とは異なる行為として患者から予め採取されている、容器に入った血液試料を受け取る段階を含みうる。さらなる例として、血液試料を得る段階は、本発明の方法の実行とは異なる行為として、患者から採取された血液試料を一時的な保管所から取り出す段階を含みうる。本発明の方法の実行はこのように、完全にエキスピボで行われうると理解される。

40

【0132】

患者から得られた生物試料は、本発明の作業の一部として、または異なる段階もしくは一連の段階のいずれかとして1回または複数回の変換段階を受けてもよい。たとえば、血液試料を患者から得る場合、本発明の方法において用いられるより簡便な型の生物試料を生じるために試料をさらに処理してもよい。これは、たとえば、IFI27遺伝子産物の評価において用いられる異なる細胞サブセットを単離するために血液を処理する段階でありう

50

る。代わりに、または加えて、これは、赤血球、または試料を採取する際に用いられうる抗凝固剤などの、本方法の効率的な操作を妨害しうる成分を除去するための単なる血液の処理でありうる。

【0133】

さらなる代替または追加の段階または複数の段階として、試料を、IFI27遺伝子産物の決定に用いられる分画、および決定に用いられない分画または複数の分画を作製するために処理してもよい。この処理または分画は、たとえば、そのいずれもがIFI27遺伝子産物を決定するために用いるために適しうる、試料からの総RNAの単離、または試料からのメッセンジャーRNA (mRNA) の単離、または試料からのタンパク質もしくはポリペプチドの単離を含みうる。当業者は、この手法で血液試料を処理するための方法、たとえばRNeasy ミニキット、Qiagen、およびFOCUSメンブレンタンパク質キット、GBiosciences protocols) が存在することを承知しているであろう。

10

【0134】

ポリヌクレオチドおよびポリペプチド

本発明者らは、インフルエンザを有する対象におけるIFI27遺伝子の発現レベルが、疾患の重症度と相関すること、それゆえ臨床的リスクの指標として利用することができることを特定した。したがって、本発明の作業において、試料はIFI27遺伝子産物の存在に関して試験されうる。遺伝子産物は、IFI27 mRNAまたは転写物でありうる。IFI27 mRNAの完全なポリヌクレオチド配列が決定されており、たとえばEnsembl/Havanaマージ: ENSG00000165949で報告されている。本明細書において示されるように、既に記述されたIFI27転写物の変種が存在する。1つの態様において、IFI27遺伝子の存在に関して試料を分析する段階は、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2に示される配列、またはその断片もしくは変種などのIFI27 mRNA配列の存在に関して試料を分析する段階を含む。

20

【0135】

遺伝子産物は、IFI27ポリペプチド、ISG12でありえて、ISG12ポリペプチドの2つのアイソフォームが報告されており、たとえば配列NP_001123552.1が決定されている。1つの態様において、IFI27遺伝子産物の存在に関して試料を分析する段階は、SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:4に示される配列またはその断片もしくは変種などのIFI27ポリペプチドの存在に関して試料を分析する段階を含む。

【0136】

本明細書において記述されるポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列に加えて、同様に、その変種および断片も本発明の範囲および本発明の方法に含まれる。それゆえ、試料が所定のポリヌクレオチド配列の存在に関して試験されうると述べられている場合、その声明はまた、試料が、そのポリヌクレオチド配列の断片または変種の存在に関して試験されうることも意味すると理解されるであろう。

30

【0137】

本発明の方法において用いられるように、本明細書において開示されるポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸 (DNA)、リボ核酸 (RNA)、または相補的デオキシリボ核酸 (cDNA) でありうる。

【0138】

RNAは、DNA配列のRNAポリメラーゼ触媒転写に由来しうる。RNAは、対応するDNA配列の転写に由来する一次転写物でありうる。RNAはまた、転写後プロセッシングを受けてもよい。たとえば、一次RNA転写物は、転写後プロセッシングを受けて、成熟RNAを形成しうる。本明細書において記述されるように、IFI27転写物の少なくとも2つのアイソフォーム、すなわち1つは665ヌクレオチドでもう1つは656ヌクレオチドのアイソフォーム (それぞれ、SEQ ID NO:1および2を参照されたい) が存在することは公知である。メッセンジャーRNA (mRNA) は、細胞によってタンパク質に翻訳されうる対応するオープンリーディングフレームに由来するRNAを意味する。cDNAは、mRNAに相補的であり、mRNAに由来する一本鎖DNAを意味する。アイソフォーム1およびアイソフォーム2 IFI27配列に対応するcDNAはそれぞれ、本明細書においてSEQ ID NO:5および6と呼ばれる。センスRNAは、mRNAを含むRNA転写物

40

50

を意味し、そのため細胞によってタンパク質に翻訳されうる。アンチセンスRNAは、標的
一次転写物またはmRNAの全てまたは一部と相補的であるRNA転写物を意味し、標的遺伝子
の発現を遮断するために用いられうる。

【0139】

当業者は、本明細書において開示されるDNA配列によってコードされるRNAおよびcDNA配
列が、遺伝子コードを用いて誘導されうることを認識するであろう。RNA配列は、特定のD
NA配列と相補的である配列を作製することによって、所定のDNA配列から誘導されうる。
相補的配列は、DNA配列における各シトシン（「C」）塩基をグアニン（「G」）塩基に、D
NA配列における各グアニン（「G」）塩基をシトシン（「C」）塩基に、DNA配列における
各チミジン（「T」）塩基をアデニン（「A」）塩基に、およびDNA配列における各アデニ
ン（「A」）塩基をウラシル（「U」）塩基に変換することによって作製されうる。

10

【0140】

相補的DNA（cDNA）配列は、上記のDNA配列からRNA配列を誘導した後、RNA配列をcDNA配
列に変換することによって、DNA配列から誘導されうる。RNA配列は、RNA配列における各
シトシン（「C」）塩基をグアニン（「G」）塩基に、RNA配列における各グアニン（「G」
）塩基をシトシン（「C」）塩基に、RNA配列における各ウラシル（「U」）塩基をアデニ
ン（「A」）塩基に、およびRNA配列における各アデニン（「A」）塩基をチミジン（「T」
）塩基に変換することによって作製されうる。

【0141】

一般的に、ポリペプチド配列変種は、共通の定性的生物活性を保有する。ポリヌクレオ
チド変種は一般的に、共通の定性的生物活性を保有するポリペプチドをコードする。した
がって、本発明者らは、IFI27の特異的配列における変化が、本明細書において提供され
る配列と比較して、コードされる遺伝子の生物活性に有意な変化を引き起こすことなく、
天然に存在する可能性があるかと想像する。その結果、本発明は、本明細書において具体
的に説明されるIFI27配列に限定されず、同様に天然に存在しうるIFI27の変種配列にも応用
可能である。本明細書におけるそのような配列は、本明細書において証明された遺伝子産
物の特徴的な発現を保持すると予想され、このため、インフルエンザ感染症を有するまた
は有することが疑われる患者または対象における臨床的リスクの指標マーカーとして等し
く応用可能である。

20

【0142】

その結果、本明細書において明白に述べられるそれらの変種配列もまた、本発明に含ま
れる。本明細書において用いられる「変種」という用語は、実質的に類似の配列を意味す
る。一般的に、2つの配列が、明記された領域にわたって、または明記されていない場合
には配列全体にわたって同じであるアミノ酸残基またはヌクレオチドの明記された百分率
（「配列同一性」の百分率）を有する場合、2つの配列は「実質的に類似」である。した
がって、本明細書において開示されるポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列の「変種
」は、参照配列と少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、
83%、85%、88%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を共
有しうる。

30

【0143】

さらに、「変種」という用語はまた、本発明のポリペプチドのアナログを含む。ポリペ
プチドの「アナログ」は、本発明のポリペプチドの誘導体であるポリペプチドであり、誘
導体は、ポリペプチドが実質的に同じ機能を保持するように、1つまたは複数のアミノ酸
の付加、欠失、置換を含む。「保存的アミノ酸置換」という用語は、ポリペプチド鎖（タ
ンパク質の一次配列）内の類似の特性を有する別のアミノ酸の代わりに1つのアミノ酸を
置換または交換することを意味する。たとえば、類似の荷電アミノ酸であるアスパラギン
酸（Asp）の代わりに荷電アミノ酸であるグルタミン酸（Glu）を用いることは、保存的ア
ミノ酸置換であろう。

40

【0144】

一般的に、2つの配列間の配列同一性の百分率は、比較ウィンドウにわたって2つの最適

50

に整列させた配列を比較することによって決定されうる。比較ウィンドウにおける配列の部分は、2つの配列を最適に整列させるために、欠失または付加を含まない参照配列（たとえば、本明細書において開示されるポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列）と比較して、たとえば欠失または付加（すなわち、ギャップ）を含みうる。次に、配列同一性の百分率は、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列に存在する位置の数を決定してマッチした位置の数を得る段階、マッチした位置の数を比較ウィンドウにおける位置の総数で除する段階、および結果に100を乗じて配列同一性の百分率を得る段階によって計算されうる。

【0145】

2つまたはそれより多くの核酸またはポリペプチド配列の文脈において、配列同一性の百分率は、以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いてまたは手動でのアライメントおよび肉眼での検分によって測定した場合に、比較ウィンドウに対して、または指定された領域に対して最大に一致するように比較および整列させた場合に、明記された領域にわたって（または明記されていない場合には、配列全体にわたって）同じであるアミノ酸残基またはヌクレオチドの明記された百分率を意味する。

【0146】

配列比較に関して、典型的に1つの配列は、試験配列が比較される参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを用いる場合、試験および参照配列をコンピューターに入力して、小配列の座標を必要であれば指定して、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトプログラムパラメータを用いることができ、または代替のパラメータを指定することができる。次に、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づいて、参照配列と比較した試験配列のパーセント配列同一性を計算する。比較のための配列のアライメント法は、当技術分野において周知である。比較のための配列の最適なアライメントは、PC/GeneプログラムにおけるCLUSTAL（Intelligenetics, Mountain View, Californiaから入手可能）；ALIGNプログラム（バージョン2.0）、およびGCG Wisconsin Genetics Software Package, Version 10におけるGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTA（Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, California, USAから入手可能）を含むがこれらに限定されるわけではない公知のコンピュータープログラムを用いて慣例的に決定することができる。

【0147】

BESTFITプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package, for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711）は、2つの配列間の相同性の最善の区間を発見するために、Smith and Watermanのローカルホモロジーアルゴリズムを用いる（Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981)）。配列間の相同性の程度を決定するために、BESTFITまたは他の任意の配列アライメントプログラムを用いる場合、参照ヌクレオチド配列の全長にわたって同一性の百分率が計算されるように、および参照配列におけるヌクレオチドの総数の5%までの相同性におけるギャップが許容されるように、パラメータが設定されうる。

【0148】

GAPは、マッチの数を最大にして、ギャップの数を最少にする2つの完全な配列のアライメントを発見するために、Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453に記述されるアルゴリズムを用いる。GAPは、可能性のある全てのアライメントおよびギャップの位置を考慮して、マッチした塩基の数が最大でギャップが最少であるアライメントを作製する。これにより、マッチした塩基の単位にギャップ作製ペナルティおよびギャップ伸長ペナルティを与えることができる。GAPは、最善のアライメントファミリーの1つのメンバーを表す。

【0149】

問い合わせ配列と被験配列のあいだの最善の全体的マッチを決定する別の方法は、グローバル配列アライメントとも呼ばれ、Brutlagと共同研究者（*Comp. App. Biosci.* 6:237-245 (1990)）のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータープログラムを用いて決定する

10

20

30

40

50

ことができる。配列アライメントにおいて、問い合わせおよび被験配列はいずれもDNA配列である。RNA配列は、UをTに変換することによって比較されうる。グローバル配列アライメントの結果は配列同一性である。

【0150】

BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムは、パーセント配列同一性および配列類似性を決定するために用いられうる。これらはそれぞれ、Altschul et al. (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402、およびAltschul et al (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410に記述される。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを通して公的に入手可能である。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードと整列させた場合に、いくつかの正の値の閾値スコアTと一致するかまたはTを満たす問い合わせ配列中の長さWの短いワードを同定することによって、ハイスコア配列ペア(HSP)を最初に同定する段階を伴う。Tは、近接ワードスコア閾値と呼ばれる(Altschul et al., 前記)。これらの初回近接ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを発見するための検索を開始するためのシードとして作用する。累積アライメントスコアを増加させることができる限り、各々の配列に沿って両方向にワードヒットが伸長する。ヌクレオチド配列の場合、パラメータM(マッチする残基のペアに関する報酬スコア; 常に>0)、およびN(ミスマッチ残基に関するペナルティスコア; 常に<0)を用いて、累積スコアを計算する。アミノ酸配列の場合、スコア行列を用いて累積スコアを計算する。各方向のワードヒットの伸長は、累積アライメントスコアがその最大到達値から量X低下した場合; 1つまたは複数の負のスコア残基アライメントの蓄積により、累積スコアがゼロまたはそれ未満になる場合; またはいずれかの配列の末端に達した場合、に停止する。BLASTアルゴリズムパラメータW、TおよびXは、アライメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列に関する)は、デフォルトとして、ワード長(W) 11、期待値(E) 10、M=5、N=4、および両方の鎖の比較を用いる。アミノ酸配列に関して、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、ワード長3、および期待値(E) 10、およびBLOSUM62スコア行列(Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915を参照されたい)、アライメント(B) 50、期待値(E) 10、M=5、N=-4、および両方の鎖の比較を用いる。

【0151】

BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列のあいだの類似性に関する統計分析も行う(たとえば、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787を参照されたい)。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの手段は、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列のマッチが偶然に存在する確率の指標を提供する最少和確率(smallest sum probability)(P(N))である。たとえば、核酸は、参照核酸に対する試験核酸の比較における最少和確率が約0.2未満、より好ましくは約0.01未満、および最も好ましくは約0.001未満である場合、参照配列と類似であると見なされる。

【0152】

同様に、本明細書において開示されるポリヌクレオチドの断片も企図される。ポリヌクレオチドの「断片」は、本発明のポリヌクレオチドまたはその変種の構成成分をコードするまたは構成成分であるポリヌクレオチド分子である。ポリヌクレオチドの断片は、必ずしも生物活性を保持するポリペプチドをコードする必要はない。断片は、たとえば、ハイブリダイゼーションプローブまたはPCRプライマーとして有用でありうる。断片は、本発明のポリヌクレオチドから誘導されてもよく、または代わりに、任意の他の手段、たとえば化学合成によって合成されてもよい。断片は、たとえばプローブまたはプライマーがIFI27遺伝子産物の領域に対して特異的であるように、および本発明の作業において検出されるのがその領域であるように、たとえば、生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルの決定において検出される断片でありうる。このことは、たとえばPCRを用いる方法では典型的であり、IFI27遺伝子産物、典型的にmRNAまたはcDNAの標的領域は、IFI27 mRNAまたはcDNA配列の全長より短い長さを構成する。たとえば、これは約50から100塩基もしくは塩基対、または約75から150塩基もしくは塩基対、または約120から250塩基もしくは塩基対、ま

たは約200から約300塩基もしくは塩基対、または約250から350塩基もしくは塩基対、または約300から400塩基もしくは塩基対、または約350から450塩基もしくは塩基対、または約400から500塩基もしくは塩基対の標的領域でありうる。

【0153】

本発明の配列は、配列全体が、本明細書において同定されたIFI27遺伝子の配列またはその断片のみを含む個別の配列を含みうる。代わりに、本発明の配列は、それらが、その遺伝子の一部ではない配列と共に、本明細書において同定されたIFI27遺伝子の配列またはその一部またはその変種を含むという点において、非個別の配列でありうる。同様に、配列はまた、精製または検出を補助するため、およびハイブリダイゼーションを補助するためなどの、ベクターに会合した配列、タグなどの無関係な配列を含みうる。

10

【0154】

ポリヌクレオチドは、ベクターにクローニングされうる。ベクターは、たとえばDNA、RNA、または相補的DNA (cDNA) 配列を含みうる。ベクターは、外来配列を挿入するように、外来配列を細胞に導入するように、および導入された配列を発現させるように適合させた、プラスミドベクター、ウイルスベクター、または他の任意の適した媒体でありうる。典型的に、ベクターは発現ベクターであり、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、ポリアデニル化シグナル、および転写終止配列などの発現制御およびプロセシング配列を含みうる。本発明はまた、そのようなベクターによって形質転換された宿主細胞も企図する。たとえば、本発明のポリヌクレオチドをベクターにクローニングしてもよく、これを細菌宿主細胞、たとえば大腸菌 (E. coli) に形質転換する。ベクターを構築する方法および宿主細胞に形質転換する方法は一般的に当技術分野において公知であり、たとえばMolecular Cloning: A Laboratory Manual 4th ed., Green and Sambrook, 2012, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, and, Ausubel F. M. et al. (Eds) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc.に記述される。

20

【0155】

ヌクレオチドプローブ、プライマー、および抗体

本発明は、対象におけるインターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子の発現レベルが、その対象におけるインフルエンザの重症度と相関することを本発明者らが同定したことに少なくとも部分的に基づいている。このように、本発明は、関心対象の対象から得られた試料中のインターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子の発現レベルの検出および決定を通して、インフルエンザ感染症の際の宿主応答を検出する方法に関する。本方法の作業において、IFI27ポリヌクレオチドの配列またはその断片もしくは変種に基づくヌクレオチドおよび断片は、インターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子産物のレベルを検出および決定するためのプライマーおよびプローブとして用いられうる。

30

【0156】

ヌクレオチドおよび断片は、オリゴヌクレオチドの形でありうる。オリゴヌクレオチドは、典型的に長さが少なくとも約5ヌクレオチドから約80ヌクレオチド、より典型的に長さが約10ヌクレオチドから約50ヌクレオチド、およびさらにより典型的に長さが約15ヌクレオチドから約30ヌクレオチドである、PCRなどの核酸増幅反応において用いるために適した一連の短いヌクレオチド残基である。当業者は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチドまたはそれより多くなどの任意の適切な長さの配列が用いられうることを理解するであろう。

40

【0157】

プローブは、典型的にハイブリダイゼーションによって相同な配列を検出するために用いられる、たとえば約10ヌクレオチドから数千ヌクレオチドのあいだの多様な長さのヌクレオチド配列である。たとえば、ハイブリダイゼーションにおいて用いるためのプローブは、約10から25塩基もしくは塩基対、または約20から40塩基もしくは塩基対、または約30から50塩基もしくは塩基対、または約50から100塩基もしくは塩基対、または約75から150

50

塩基もしくは塩基対、または約120から250塩基もしくは塩基対、または約200から300塩基もしくは塩基対、または約250から350塩基もしくは塩基対、または約300から400塩基もしくは塩基対、または約350から450塩基もしくは塩基対、または約400から500塩基もしくは塩基対でありうる。ハイブリダイゼーションプローブは、ゲノムDNA断片、cDNA断片、RNA断片、または他のオリゴヌクレオチドでありうる。

【0158】

ヌクレオチドプローブおよび/またはプライマーを設計および/または作製する方法は、一般的に当該技術分野において公知であり、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Green and Sambrook, 2012,; Itakura K. et al. (1984) Annu. Rev. Biochem.

53:323; Innis et al., (Eds) (1990) PCR Protocols; A Guide to Methods and Applications (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, (Eds) (1995) PCR Strategies (Academic Press, New York); and Innis and Gelfand, (Eds) (1999) PCR Methods Manual (Academic Press, New York)に記述される。ヌクレオチドプライマーおよびプローブは、たとえば化学合成技術、たとえばホスホジエステルおよびホスホトリエステル法(たとえば, Narang S. A. et al. (1979) et al. Enzymol. 68:90; Brown, E. L. (1979) et al. Meth. Enzymol. 68: 109; および米国特許第4356270を参照されたい)、ジエチルホスホラミダイト法(Beaucage S.L et al. (1981) Tetrahedron Letters, 22: 1859-1862を参照されたい)によって調製されうる。修飾された固相支持体上でオリゴヌクレオチドを合成する方法は、米国特許第4458066号に記述される。

【0159】

本明細書において言及した核酸を含む本発明の核酸は、検出を容易にするためにマーカを組み入れることによって標識されうる。核酸を標識および検出する技術は、たとえば Ausubel F. M. et al. (Eds) Current Protocols in Molecular Biology (2007), John Wiley and Sons, Inc.およびMolecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Green and Sambrook, 2012に記述される。適したマーカの例には、蛍光分子(たとえば、アセチルアミノフルオレン、5-ブロモデオキシウリジン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン)、および放射活性同位元素(たとえば、³²P、³⁵S、³H、³³P)が挙げられる。マーカの検出は、たとえば化学、光化学、免疫化学、生化学、または分光技術によって行われうる。

【0160】

ハイブリダイゼーション技術において、既知のヌクレオチド配列の全てまたは一部を用いて、所定の試料に存在する他の対応する核酸配列に選択的にハイブリダイズするプローブを作製する。ハイブリダイゼーションプローブは、ゲノムDNA断片、cDNA断片、RNA断片、または他のオリゴヌクレオチドでありえて、検出可能なマーカによって標識されうる。このように、たとえばハイブリダイゼーションのためのプローブは、本発明の配列に基づく合成オリゴヌクレオチドを標識することによって作製されうる。

【0161】

プローブと標的配列のあいだの相同性(配列同一性)のレベルは、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーによって主に決定されるであろう。特に、プローブとして用いられるヌクレオチド配列は、低ストリンジェンシー、中等度のストリンジェンシー、または高ストリンジェンシー条件下で、本明細書において開示されるポリヌクレオチドの相同体または他の変種とハイブリダイズしうる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを変化させるために用いられうる、当業者に周知の多数の条件および要因が存在する。例として、明記された核酸にハイブリダイズする核酸の長さおよび性質(DNA、RNA、塩基組成); ホルムアミド、硫酸デキストラン、ポリエチレングリコール等の有無などの塩および他の成分の濃度; ならびにハイブリダイゼーションおよび/または洗浄段階の温度の変化。

【0162】

典型的に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、pH 7.0から8.3で、塩濃度が約1.5 M未満のNaイオン、典型的に約0.01から1.0 MのNaイオン濃度(または他の塩

）であり、ならびに温度は短い（たとえば、10から50ヌクレオチド）プローブに関して少なくとも約30、および長い（たとえば、50ヌクレオチドより長い）プローブに関して少なくとも約60である条件であろう。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドなどの脱安定化剤の添加によっても達成されうる。例示的な低ストリンジェンシー条件には、30%から35%ホルムアミド、1 M NaCl、1% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）の緩衝液による37でのハイブリダイゼーション、および1×または2×SSC（20×SSC = 3.0 M NaCl / 0.3 M クエン酸三ナトリウム）中で50から55での洗浄が挙げられる。例示的な中等度のストリンジェンシー条件には、40%から45%ホルムアミド、1.0 M NaCl、1% SDS中で37でのハイブリダイゼーション、および0.5×から1×SSC中で55から60での洗浄が挙げられる。例示的な高ストリンジェンシー条件には、50%ホルムアミド、1 M NaCl、1% SDS中で37でのハイブリダイゼーション、および0.1×SSC中で60から65で少なくとも約20分間の最終洗浄が挙げられる。任意で、洗浄緩衝液は、約0.1%から約1% SDSを含みうる。ハイブリダイゼーションの期間は一般的に、約24時間未満、通常約4から約12時間である。

【0163】

PCRアプローチにおいて、関心対象の任意の生物から抽出されたcDNAまたはゲノムDNAからの対応するDNA配列を増幅するために、PCR反応において用いるためのオリゴヌクレオチドプライマーを設計することができる。PCRプライマーを設計する方法およびPCRクロニングの方法は、一般的に当技術分野において公知であり、Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York); Ausubel F. M. et al. (Eds) *Current Protocols in Molecular Biology* (2007), John Wiley and Sons, Inc; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed., Green and Sambrook, 2012; Maniatis et al. *Molecular Cloning* (1982), 280-281; Innis et al. (Eds) (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, (Eds) (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); and Innis and Gelfand, (Eds) (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York)に開示される。公知のPCR法には、プライマー対、ネステッドプライマー、シングル特異的プライマー、縮重プライマー、遺伝子特異的プライマー、ベクター特異的プライマー、部分的ミスマッチプライマー、およびその他を用いる方法が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。

【0164】

当業者は、PCRまたはRT-PCRにおいて用いるための本明細書において記述されるプライマーもまた、インターフェロン誘導タンパク質27（IFI27）遺伝子産物の検出などの、関心対象の配列を検出するためのプローブとしても用いられうることを認識する。

【0165】

特定の態様において、断片またはプローブは、IFI27遺伝子の断片たとえばノザン分析などのハイブリダイゼーション分析に用いられうる断片である。特異的な例として、Suomelaら（2004）は、ヒトIFI27 cDNAの482 bp断片を用いて培養ヒト細胞からの総RNA単離体中にIFI27 RNA転写物を検出したことを記述している。IFI27核酸配列またはその変種の任意の適切な長さの断片が、本発明の方法において用いられうる。当業者は、本明細書において提供される情報に基づいて、および当技術分野において公知の方法、たとえば所望の条件下で標的配列に特異的に結合する配列を選択する方法に従って、適切な配列を決定することができるであろう。

【0166】

特定の態様において、断片、プローブ、またはプライマーは、IFI27遺伝子の断片であり、たとえば配列

ACCTCATCAGCAGTGACCAGT

（フォワードプライマー；SEQ ID NO:7）、または配列

ACATCATCTTGGCTGCTATGG

（リバープライマー；SEQ ID NO:8）である。本発明の方法の特異的な態様において、PCR

は、187 bpの配列 (SEQ ID NO:11) を増幅するプライマー対
ACCTCATCAGCAGTGACCAGT (SEQ ID NO:7)
および配列
ACATCATCTTGGCTGCTATGG (SEQ ID NO:8)
を用いて行われうる。

【0167】

特定の態様において、断片、プローブ、またはプライマーは、IFI27遺伝子の断片であり、たとえばIFI27遺伝子に対して特異的である当技術分野において公知の配列またはその断片もしくは変種である。当業者は、本発明の方法においてそのような核酸配列を用いるための適切な条件を決定することができるであろう。

10

【0168】

特定の態様において、断片、プローブ、またはプライマーは、IFI27遺伝子の断片、たとえば配列

TGC CTC GGG CAG CCT (SEQ ID NO:9)

または配列

TTG GTC AAT CCG GAG AGT CC (SEQ ID NO:10)

である。本発明の方法の特異的態様において、PCRは、プライマー対

TGC CTC GGG CAG CCT

20

(フォワードプライマー ; SEQ ID NO:9) および配列

TTG GTC AAT CCG GAG AGT CC

(リバースプライマー ; SEQ ID NO:10) を用いて行われうる⁵。当業者は、本発明の方法においてそのような核酸配列を用いるための適切な条件を決定することができるであろう。当業者はまた、その内容が参照により本明細書に組み入れられる、Suomelaら⁵において、IFI27遺伝子産物の増幅および検出のためにそのような核酸配列を用いるための指針を見いだすであろう。

【0169】

特定の態様において、断片、プローブ、またはプライマーは、IFI27遺伝子の断片、たとえば配列

30

cag gaa ttc atA TGG AGG CCT CTG CTC TCA (ISG12f; SEQ ID NO:16)

または配列

cgc gaa ttc agC TAG TAG AAC CTC GCA ATG (ISG12r; SEQ ID NO:17)

である。本発明の方法の特異的態様において、PCRは、プライマー対

cag gaa ttc atA TGG AGG CCT CTG CTC TCA (ISG12f; SEQ ID NO:16)

および配列

40

cgc gaa ttc agC TAG TAG AAC CTC GCA ATG (ISG12r; SEQ ID NO:17)

を用いて行われうる⁸。ISG12fおよびISG12rに記載される配列において、大文字はcDNA配列に対応する。当業者は、本発明の方法においてそのような核酸配列を用いるための適切な条件を決定することができるであろう。当業者は、その内容が参照により本明細書に組み入れられるGjermandsen et al (1999)⁸において、IFI27遺伝子産物を増幅および検出するためのそのような核酸配列の使用に関する指針を見いだすであろう。

【0170】

抗体

IFI27遺伝子によってコードされるポリペプチドまたはその断片もしくは変種に特異的

50

に結合することができる抗体もまた、本発明の方法によって企図される。抗体または複数の抗体は、所定の試料における1つまたは複数のポリペプチド、詳しくはIFI27遺伝子によってコードされるポリペプチドまたは断片を定性的または定量的に検出および分析するために用いられうる。アッセイの対照または正規化の目的のために、追加のポリペプチドの抗体検出および定量も同様に行われうる。「特異的に結合する」とは、無関係なタンパク質に結合する場合より高い親和性で抗体が標的ポリペプチドまたはその断片に結合することができる」と理解されるであろう。たとえば、抗体は、少なくとも約 10^{-4} Mから約 10^{-10} Mの範囲の結合定数でポリペプチドまたはその断片に結合しうる。好ましくは、結合定数は、少なくとも約 10^{-5} M、または少なくとも約 10^{-6} Mであり、より好ましくは関心対象のポリペプチドまたはその断片に対する抗体の結合定数は、少なくとも約 10^{-7} M、少なくとも約 10^{-8} M、または少なくとも約 10^{-9} Mであるか、またはそれより高い。

10

【0171】

抗体は、たとえば抗体全体、または抗体断片、または相補性決定領域などの他の免疫学的に活性なその断片を含む多様な形状で存在しうる。同様に、抗体は、機能的抗原結合ドメイン、すなわち重鎖および軽鎖可変ドメインを有する抗体断片として存在しうる。同様に抗体断片は、Fv、Fab、F(ab)₂、scFv（一本鎖Fv）、dAb（シングルドメイン抗体）、キメラ抗体、二重特異性抗体、ディアボディおよびトリアボディからなるがこれらに限定されない群より選択される形状で存在しうる。

【0172】

抗体「断片」は、抗体全体の修飾によって、または所望の抗体断片の合成によって產生されうる。抗体断片を含む抗体を作製する方法は当技術分野において公知であり、たとえば組み換えDNA技術による合成を含む。当業者は、たとえば米国特許第5296348号およびAusubel F. M. et al. (Eds) *Current Protocols in Molecular Biology* (2007), John Wiley and Sons, Inc.に記述される抗体などの抗体を合成する方法を承知しているであろう。

20

【0173】

好ましくは、抗体は、関心対象ポリペプチドの個別の領域または断片から調製される。関心対象のポリペプチドの抗原性部分は、アミノ酸約5個から約15個などの任意の適切な長さの部分でありうる。好ましくは、抗原性部分は、アミノ酸残基少なくとも約5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個または14個を含む。

30

【0174】

本明細書の文脈において、IFI27遺伝子によってコードされるポリペプチドに対して特異的な抗体という言葉はまた、関心対象のポリペプチドの断片または変種に対して特異的である抗体を含む。

【0175】

本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体は、たとえば当技術分野において公知の任意の適した方法を用いてIFI27遺伝子によってコードされる精製ポリペプチドを用いて調製することができる。たとえば、典型的にFab部分を含むモノクローナル抗体は、Harlow and Lane (Eds) *Antibodies - A Laboratory Manual*, (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y; Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (1986) 2nd ed; and Kohler & Milstein, (1975) *Nature* 256: 495-497に記述されるハイブリドーマ技術を用いて調製されうる。そのような技術は、ファージまたは類似のベクターにおける組み換え型抗体のライブラリから抗体を選択することによる抗体調製、ならびにウサギまたはマウスを免疫することによるポリクローナルおよびモノクローナル抗体の調製を含むがこれらに限定されるわけではない（たとえば、Huse et al. (1989) *Science* 246: 1275-1281; Ward et al. (1989) *Nature* 341:544-546を参照されたい）。

40

【0176】

本発明の抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体、および完全なヒト抗体を含むと同様に理解されるであろう。本発明の抗体は、1つより多くの抗原またはエピトープに対して結合特

50

異性を有する二重特異性抗体でありうる。ヒト化抗体、キメラ抗体、完全なヒト抗体、および二重特異性抗体を調製する方法は、当技術分野において公知であり、たとえばGarabedian, et al. に対して2006年2月7日に公布された、"Antibodies that recognize and bind phosphorylated human glucocorticoid receptor and methods of using same"と題する米国特許第6995243号に記載される方法を含む。

【0177】

概して、おそらくIFI27遺伝子によってコードされるポリペプチドを含む試料に、ポリペプチドまたはその断片に特異的に結合する抗体を接触させることができる。任意で、抗体を試料に接触させる前に、洗浄および複合体のその後の単離を容易にするために、抗体を固相支持体に固定することができる。固相支持体の例には、たとえばマイクロタイタープレート、ビーズ、チップ、またはマイクロビーズが挙げられる。抗体はまた、上記のようにProteinChipアレイまたはプローブ基質に結合させることができる。

10

【0178】

関心対象のポリペプチドに結合した抗体を同定するための検出可能な標識は、蛍光色素、蛍光染料、放射標識、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、および当技術分野において一般的に用いられる他の酵素などの酵素、ならびに金コロイドまたは着色ガラスもしくは着色プラスチックビーズを含む比色測定標識を含むがこれらに限定されるわけではない。または、試料中のマーカーを、たとえば第二の標識抗体を用いて、結合したマーカー特異的抗体を検出する間接アッセイを用いて検出することができる。

【0179】

20

抗体-マーカー複合体の存在を検出するまたは量を測定する方法は、たとえば、蛍光、化学発光、発光、吸光度、複屈折、透過率、反射率の検出、または表面プラズモン共鳴などの屈折指数、バイオセンサー、偏光解析法、共鳴ミラー法、グレーティングカップラー波形誘導法、または干渉法を含む。無線周波数法は、多極性共鳴分光法を含む。電気化学法は、電流滴定およびボルタンメトリー法を含む。光学法は、イメージング法および非イメージング法および顕微鏡を含む。

【0180】

抗体-マーカー複合体の存在を検出または量を測定するために有用なアッセイは、たとえば酵素免疫測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、またはウェスタンブロットアッセイを含む。そのような方法は、たとえばClinical Immunology (Stites & Terr, eds., 7th ed. 1991); Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology, volume 37 (Asai, ed. 1993); and Harlow & Lane, supraに記述される。

30

【0181】

特定の態様において、本発明の方法は、当技術分野において公知の1つまたは複数の抗体を利用しうる。IFI27ポリペプチドに結合することができる抗体は当技術分野において公知であり、抗IFI27ポリクローナル抗体カタログ番号; LS-C70809、LSBio; IFI27ポリクローナル抗体(A01)カタログ番号: H00003429-A01、Abnova Corporation; IFI27ポリクローナル抗体カタログ番号: PAB8961、Abnova Corporation; IFI27抗体カタログ番号: H00003429-A01、Novus Biologicals; IFI27抗体カタログ番号: H00003429-D01P、Novus Biologicals; IFI27ウサギポリクローナル抗体(Sapphire Bioscience, USA)、IFI27 MaxPabウサギポリクローナル抗体を含む。

40

【0182】

本明細書において示されるように、イムノアッセイおよび関連法によるIFI27発現の試験は、Nzeusseu Toukap et al (2007; その内容が参照により本明細書に組み入れられる)などの文献に報告されており、本発明の方法、試薬、装置、およびキットは、IFI27の試験に関してこれまでに報告された抗体の使用を組み入れうると認識される。本発明、およびそれゆえ本発明の方法、試薬、装置、およびキットは、本明細書の記述に従う任意の適した抗体を含み、本明細書において具体的に言及したそれらの抗体のみに制限されないと認識されるであろう。当業者は、適した抗体が、文献検索、ルーチンの検査を通して同定されうること、およびwww.antibodies-online.comなどのオンラインデータベースに記

50

載されうることを承知しているであろう。

【0183】

検出のための方法およびキット

本明細書において用いられるように、インターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子産物のレベルを決定する段階は、様々な態様において、試料中の遺伝子産物の存在、非存在、または量を決定する段階を含み、試料中の遺伝子産物の量を定量する段階を含みうる。好ましい態様において、本発明の方法の全ての段階は、対象のヒトの体または動物の体などの対象の体の外部で起こり、本方法は体において実践されない。そのため、好ましい態様において、本発明は、ヒトまたは動物の体において実践されるいかなる物理的介入も伴わない。

10

【0184】

IFI27遺伝子産物のレベルを決定する段階は、所定の試料が、別の試料または参照と比較することによって、IFI27遺伝子産物の存在に関して評価される場合、たとえば試験試料が参照の遺伝子産物より多い、より少ない、またはほぼ同じ量であることが見いだされる場合などの相対的定量を含む。

【0185】

定量する、したがってレベルを決定する段階はまた、試料に対して特異的なアッセイ内での差を説明するために試料または方法の正規化を含みうる。典型的に、これは、試料中で検出可能な別の成分のレベルを決定する段階を含む。たとえば、IFI27遺伝子産物のレベルを決定する段階が、IFI27 mRNA転写物レベルの決定を含む場合、試料は、本発明の実行の際の試料間の差を説明するために正規化されうる。内部基準マーカーは、遺伝子産物などの試料中の任意の適切な成分でありえて、典型的にその存在が、健康な対象と健康でない対象の試料において均一である成分、またはその存在がインフルエンザに感染していない対象とインフルエンザに感染している対象の試料において均一である成分であろう。特異的な例として、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子産物が内部基準として用いられる。

20

【0186】

このように、本発明の方法は、患者の生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルを、臨床的リスクを示す参照標準と比較する段階を含む。任意の適した参照標準を用いてもよい。たとえば、参照標準は、健康な対象の試料でありうるか、または健康な対象において見いだされる量の典型であるIFI27遺伝子産物の量でありうる。この場合、標準と比較して患者の試料中の高いIFI27レベルが、患者の臨床的リスクを示す。さらなる例として、参照標準は、インフルエンザウイルスに感染した症候性対象の試料であってよく、または重度の疾患を発症していないインフルエンザウイルスに感染した対象において認められる量の典型であるIFI27遺伝子産物量であってよく、そのような参照標準と比較して患者の試料中の高いIFI27レベルが、患者における臨床的リスクを示す。

30

【0187】

参照標準は、臨床的リスクを示す場合もあり、この場合、参照と比較して患者の試料中の等しいかまたは高いIFI27遺伝子産物レベルが、対象の臨床的リスクを示す。

【0188】

さらなる例として、参照標準は、臨床的リスクを定義する標準曲線でありうる。この場合、参照標準は、患者の試料中のIFI27遺伝子産物レベルの決定とは無関係でありえて、たとえば標準曲線は、臨床的リスクを定義する提供された参照曲線の形状でありうる。

40

【0189】

参照標準は、患者の生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルの決定と同時に調製されうる。たとえば、これはIFI27遺伝子産物の1つまたは複数の既知試料を、患者の生物試料と同じIFI27遺伝子産物レベルの決定法に供することによる標準物質の調製を含みうるが、この場合、IFI27遺伝子産物の1つまたは複数の既知試料は、臨床的リスクを示すもしくは臨床的リスクを示さないある既定量もしくは複数の既定量の試料であるか、または5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、100倍、200倍、300倍、500倍、もしくは1000倍など

50

の、臨床的リスクを有しないもしくは臨床的リスクがごくわずかである対象の典型的な量に対して選択された増加倍率を示す試料である。

【0190】

本明細書における本発明の特異的態様において、特にIFI27遺伝子産物の定量的検出が行われる実施例において示されるように、健康なまたは無症候性の個体において認められるレベルと比較すると、インフルエンザ感染症による重度の疾患を発症している患者の試料中で検出されるIFI27遺伝子産物は、少なくともおよそ40倍から60倍増加した。健康なまたは無症候性の個体と比較すると、インフルエンザまたはウイルス性肺炎を有する患者の試料中で検出されるIFI27遺伝子産物は、少なくともおよそ10倍増加した。

【0191】

IFI27遺伝子産物レベルを決定する段階はまた、試料中のIFI27遺伝子産物の量が適切な単位で表記されうるように決定される絶対的定量を含んでもよく、たとえば量は、1ミリリットルあたり、1マイクロリットルあたり、1ナノリットルあたりおよびその他の容積あたりのグラム、マイクログラム、ナノグラム、ピコグラム、フェントグラム、およびその他などの試料の変化倍率、単位/容量として表記されうる。

【0192】

カットオフ値は、本発明の多様な態様において実施されうる。たとえば、1つの態様において、カットオフ値は、試料1 mlあたりの量に関する測定などの、試料中のIFI27遺伝子産物の実際の量の定量的測定によって実施されうる。別の態様において、カットオフ値は、所望のカットオフ値で検出可能性の下限または閾値を設定することによって実施されうる。このようにして、試料中にIFI27遺伝子産物が検出されれば（この文脈において、陽性シグナルと呼ばれうる）、試料提供対象におけるインフルエンザ感染症による重度の疾患を示すが、試料中のIFI27遺伝子産物が検出不能であれば（この文脈において陰性シグナルと呼ばれうる）、試料提供対象がインフルエンザを有しないまたは無症候性であることを示す。そのような態様は、任意の適した陽性/陰性カットオフ値で、比較的迅速な診断が望ましい状況または比較的洗練された試験機器が必ずしも利用可能でない状況において特に有用でありうる。これは、たとえばポイントオブケアまたは内科医の診察室で起こりうる。

【0193】

本明細書において開示されるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの検出は、任意の適した方法を用いて行われうる。たとえば、ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドなどのIFI27遺伝子産物の検出法は、IFI27遺伝子産物に対して特異的なプライマー、プローブ、または抗体の使用を伴いうる。当業者がプライマー、プローブまたは抗体を利用する適した技術およびアッセイは、たとえばポリメラーゼ連鎖反応（およびこの技術の関連版）、ELISAおよびフローサイトメトリーなどの抗体に基づくアッセイ、ならびに蛍光顕微鏡を含む。それによって、本明細書において開示される特徴的なポリペプチドが同定されうる方法は、一般的に公知であり、たとえば、Coligan J. E. et al. (Eds) *Current Protocols in Protein Science* (2007), John Wiley and Sons, Inc; Walker, J. M., (Ed) (1988) *New Protein Techniques: Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Clifton, N.J; and Scopes, R. K. (1987) *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd. Ed., Springer-Verlag, New York, N.Yに記述される。たとえば、IFI27によってコードされるポリペプチドは、ウェスタンブロットまたは分光光度測定分析によって検出されうる。ポリペプチドを検出するための適した方法の他の例は、たとえば米国特許第4683195号、米国特許第6228578号、米国特許第7282355号、米国特許第7348147号、およびPCT国際公開番号WO/2007/056723に記述される。

【0194】

本発明の好ましい態様において、IFI27遺伝子産物レベルの検出および決定は、IFI27遺伝子産物の配列またはその変種もしくは断片に特異的にハイブリダイズするプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応によって関心対象試料のヌクレオチド配列を増幅する段階、および増幅した配列を検出する段階によって行われる。この場合、典型的な標的配列は

10

20

30

40

50

、SEQ ID NO:1もしくはSEQ ID NO:2に示される配列を有する配列などのIFI27 mRNA、またはSEQ ID NO:5もしくはSEQ ID NO:6に示される配列を有する配列などのIFI27のcDNA配列、またはその任意の断片もしくは変種である。本発明の態様において、多数の標的配列、断片、またはその変種を使用してもよい。

【0195】

方法は、多数の配列、その断片または変種を検出する段階を含みうる。本方法はまた、本方法が正しくもしくは一貫して実行されるための、またはmRNA発現レベルを試料間で正規化するためなどのために対照を含める段階を含みうる。たとえば、本方法は、GAPDHなどの構成的に発現されることが知られている、またはインフルエンザに感染した対象およびインフルエンザに感染していない対象において一貫したレベルで発現されることが知られている1つまたは複数のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、またはその断片もしくは変種の検出を含みうる。

10

【0196】

本発明の方法およびキットを用いて分析するための、必要なまたは望ましい程度まで核酸を抽出および精製する適した方法は、一般的に当技術分野において公知であり、たとえば、Ausubel F. M. et al. (Eds) Current Protocols in Molecular Biology (2007), John Wiley and Sons, Inc; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Green and Sambrook, 2012に記述される。当業者は、本発明がその中で記述される特異的な核酸の単離法に限定されないこと、および他の適した方法が本発明に含まれることを容易に認識するであろう。本発明は、核酸を分析する前に核酸を単離することなく行われうる。

20

【0197】

本発明の目的のために、ポリペプチドを必要なまたは望ましい程度に抽出および精製するための適した方法は、一般的に公知であり、たとえばColigan J. E. et al. (Eds) Current Protocols in Protein Science (2007), John Wiley and Sons, Inc; Walker, J. M., (Ed) (1988) New Protein Techniques: Methods in Molecular Biology, Humana Press, Clifton, N.J; and Scopes, R. K. (1987) Protein Purification: Principles and Practice, 3rd. Ed., Springer-Verlag, New York, N.Y.に記述される。タンパク質抽出のための適した技術の例には、透析、限外濾過、および沈殿が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。用いるために適したタンパク質精製技術は、逆相クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、遠心分離、ゲル濾過、硫酸アンモニウム沈殿、およびイオン交換を含むがこれらに限定されるわけではない。

30

【0198】

本発明の方法およびキットに従って、ポリヌクレオチドまたはその変種もしくは断片は、当技術分野において公知の任意の適した手段によって検出されうる。本発明の好ましい態様において、ポリヌクレオチドは、PCR増幅によって検出される。PCRアプローチにおいて、IFI27遺伝子産物を表すポリヌクレオチドを増幅するために、PCR反応において用いるためのオリゴヌクレオチドプライマーを設計することができる。典型的に、PCRは、関連する配列の逆転写 (RT-PCR) による、メッセンジャーRNA (mRNA) から調製された相補的DNA (cDNA) の定量的増幅を含む。公知のPCR法は、プライマー対、ネステッドプライマー、シングル特異的プライマー、縮重プライマー、遺伝子特異的プライマー、ベクター特異的プライマー、部分的ミスマッチプライマー、およびその他を用いる方法を含むがこれらに限定されるわけではない。PCRおよびRT-PCRプライマーを設計する方法は当技術分野において一般的に公知であり、たとえば、Ausubel F. M. et al. (Eds) Current Protocols in Molecular Biology (2007), John Wiley and Sons, Inc; Maniatis et al. Molecular Cloning (1982), 280-281; Innis et al. (Eds) (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, (Eds) (1995) PCR Strategies (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, (Eds) (1999) PCR Methods- Manual (Academic Press, New York); and Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Green and

40

50

Sambrook, 2012;に開示される。

【0199】

当業者は、PCRおよびRT-PCR手順の様々なパラメータを変化させてもよく、それでも所望の産物を達成する能力に影響を及ぼさないことを容易に認識するであろう。たとえば、塩濃度を変化させてもよく、または変性、アニーリング、および伸長段階の1つまたは複数の時間および/または温度を変化させてもよい。同様に、DNA、cDNA、またはRNA鋳型の量も、入手可能な核酸の量、または効率的な増幅にとって必要な鋳型の最適用量に応じて変化してもよい。本発明の方法およびキットにおいて用いるためのプライマーは、典型的にオリゴヌクレオチドであり、典型的に長さが約5ヌクレオチドから約80ヌクレオチドであり、より典型的に長さが約10、11、12、13、または14ヌクレオチドから約50ヌクレオチドであり、さらにより典型的に、長さが15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチドのいずれかなどの、長さが約15ヌクレオチドから長さ約30ヌクレオチドである。当業者は、本明細書において記述されるプライマーが、PCR、RT-PCR、および浸潤性の高い株の特徴として本明細書において同定される配列を検出するためのプローブの使用を含むがこれらに限定されるわけではない多数の異なる応用にとって有用でありうることを認識するであろう。

10

【0200】

そのようなプライマーは、たとえば適切な配列の直接化学合成、またはクローニング、および制限を含む任意の適した方法によって調製することができる。プライマーにおける必ずしも全ての塩基が、プライマーがハイブリダイズする鋳型分子の配列を反映する必要はなく、プライマーは、プライマーを鋳型にハイブリダイズさせることができるために十分な相補的塩基を含む必要があるだけでよい。プライマーはまた、1つまたは複数の位置でミスマッチ塩基、すなわち鋳型における塩基とは相補的でなく、むしろ塩基の伸長または増幅の際にDNAに変化を組み入れるように設計される塩基も含みうる。プライマーは、たとえば増幅されたDNAのクローニングを容易にするために、5'末端で制限酵素認識配列の形で追加の塩基を含みうる。

20

【0201】

当業者は、IFI27 mRNA配列またはその断片を表す配列を増幅することができる任意のプライマーが、本発明の方法において用いるために適していることを認識するであろう。IFI27 mRNA配列はSEQ ID NO:1および2に示される。SEQ ID NO:1および2の配列またはその断片もしくは変種を含む核酸を増幅するために適した任意のオリゴヌクレオチドプライマー対を用いてもよい。当業者は、IFI27 mRNA転写物を表す配列を、PCR増幅などを通して検出するためのルーチンを通して、適したプライマーおよびプライマー対を選択することができることを承知しているであろう。

30

【0202】

特異的な例として、PCR増幅は、

(i) ACCTCATCAGCAGTGACCACT (フォワードプライマー; SEQ ID NO:7) および
ACATCATCTTGGCTGCTATGG (リバースプライマー; SEQ ID NO:8); (ii) TGC CTC GGG
CAG CCT (フォワードプライマー; SEQ ID NO:9) および TTG GTC AAT CCG GAG AGT CC
(リバースプライマー; SEQ ID NO:10); (iii) cag gaa ttc atA TGG AGG CCT CTG CTC TCA
(ISG12f; SEQ ID NO:16) および cgc gaa ttc agC TAG TAG AAC CTC GCA ATG (ISG12r;
SEQ ID NO:17)

40

からなる群より選択されるプライマー対を利用しうる。

【0203】

例示されるオリゴヌクレオチドプライマーの変種および断片も、同様に本発明の範囲に含まれる。当業者はまた、本発明が、例示される特異的プライマーの使用に限定されず、プライマーが関心対象の特徴的な配列の増幅を可能にするために適切に設計されている限り、代わりのプライマー配列も同様に用いてもよいことを認識するであろう。当業者は、

50

不適当な実験を行うことなく、ルーチンの手順を用いて、適したプライマー配列を決定することができる。所望の配列を増幅するために適したプライマーの位置は、G+C含有量および配列の望ましくない二次構造形成能などの要因によって決定されうる。

【0204】

増幅された核酸の適した分析法は当業者に周知であり、たとえばSambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York); Ausubel F. M. et al. (Eds) *Current Protocols in Molecular Biology* (2007), John Wiley and Sons, Inc; and Maniatis et al. *Molecular Cloning* (1982), 280-281に記述される。増幅された核酸の適した分析法は、たとえば制限酵素消化を予め行ってもよく行わなくてもよいゲル電気泳動、および/または核酸シーケンシングを含む。ゲル電気泳動は、サイズに基づいてDNA断片を分離するために当業者によって一般的に用いられる技術であるアガロースゲル電気泳動またはポリアクリルアミドゲル電気泳動を含みうる。ゲルにおけるアガロースまたはポリアクリルアミドの濃度は、ゲルの解像能を大きく左右して、それゆえ、アガロースまたはポリアクリルアミドの適切な濃度は、識別されるDNA断片のサイズに依存するであろう。

10

【0205】

本発明の他の態様において、ポリヌクレオチドおよびその変種または断片であるIFI27遺伝子産物は、適したプローブを用いることによって検出されうる。プローブは、mRNAまたはその増幅された誘導体などのIFI27遺伝子産物に選択的にハイブリダイズすることができる任意の適したプローブでありうる。プローブは、たとえば典型的にハイブリダイゼーションによって相同な配列を検出するために用いられる、約10ヌクレオチドから数千ヌクレオチドのあいだの多様な長さのヌクレオチド配列である。IFI27 mRNA転写物を表す配列を検出するために、プローブは典型的に、転写物の長さより短いか、またはそれに等しいサイズのプローブであろう。本発明のハイブリダイゼーションプローブは、ゲノムDNA断片、cDNA断片、RNA断片、または他のオリゴヌクレオチドでありうる。

20

【0206】

ヌクレオチドプローブを設計および/または作製するための方法は、当技術分野において一般的に公知であり、たとえば、Robinson P. J., et al. (Eds) *Current Protocols in Cytometry* (2007), John Wiley and Sons, Inc; Ausubel F. M. et al. (Eds) *Current Protocols in Molecular Biology* (2007), John Wiley and Sons, Inc; Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York; and Maniatis et al. *Molecular Cloning* (1982), 280-281に記述されている。ヌクレオチドプローブは、たとえば化学合成技術、たとえばホスホジエステルおよびホストリエステル法(たとえば、Narang S. A. et al. (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90; Brown, E. L. (1979) et al. *Meth. Enzymol.* 68: 109; および米国特許第4356270号を参照されたい)、ジエチルホスホラミダイト法(Beaucage S.L et al. (1981) *Tetrahedron Letters*, 22: 1859-1862を参照されたい)によって調製されうる。修飾された固相支持体上でオリゴヌクレオチドを合成する方法は、米国特許第4458066号に記述される。

30

【0207】

本発明のプローブ、または本発明の方法およびキットにおいて用いるためのプローブは、その検出を容易にするためにマーカを組み入れることによって標識されうる。核酸を標識および検出するための技術は、たとえば、Ausubel F. M. et al. (Eds) *Current Protocols in Molecular Biology* (2007), John Wiley and Sons, Inc.に記述される。適したマーカの例には、蛍光分子(たとえば、アセチルアミノフルオレン、5-ブロモデオキシウリジン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン)、および放射活性同位元素(たとえば、³²P、³⁵S、³H、³³P)が挙げられる。マーカの検出は、たとえば化学、光化学、免疫化学、生化学、または分光技術によって行われうる。

40

【0208】

本発明の方法およびキットはまた、本発明のポリペプチドに特異的に結合することがで

50

きる抗体の使用を含む。抗体は、所定の試料中の1つまたは複数のポリペプチドを定性的または定量的に検出および分析するために用いられうる。抗体の作製および使用法は、当技術分野において一般的に公知であり、たとえばHarlow and Lane (Eds) *Antibodies - A Laboratory Manual*, (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y: Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (1986) 2nd ed; and Kohler & Milstein, (1975) *Nature* 256: 495-497に記述される。抗体を、たとえばフローサイトメトリー、免疫組織化学、または当技術分野において公知の他の手段による検出を可能にするために蛍光色素にコンジュゲートさせてもよい。または、抗体を、比色測定または化学発光検出を可能にする基質に結合させてもよい。本発明はまた、本発明のポリペプチドに特異的に結合することができる1つまたは複数の抗体に結合することができる二次抗体を用いることも企図する。

10

【0209】

本発明の方法において、たとえば試料の使用または調製に関する記述は、状況に応じて当業者によって決定されうるように、利用可能な全量より少ない量を用いることを含むと理解されるであろう。たとえば、患者から得られた血液試料から総RNAの単離体を調製する記述において、当業者が適当であると考えれば、血液試料全体を用いる必要はなく、その代わりに試料の一部を用いてもよい。別の例として、総RNA単離体の逆転写によるcDNAの調製において、当業者が必要であると考えれば、総RNA単離体全体を用いる必要はなく、その代わりに総RNA単離体の一部を用いてもよい。

20

【0210】

キット

本発明は、IFI27遺伝子産物の存在を検出するための少なくとも1つの物質を含む、生物試料中のインターフェロン 誘導タンパク質27 (IFI27) 遺伝子産物のレベルを決定するためのキットを提供する。物質は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドでありうるIFI27遺伝子産物を検出することができる物質でありうる。本明細書において記述される配列を検出することができる任意の適した物質がキットに含まれうる。非制限的な例には、プライマー、プローブ、および抗体が挙げられる。

【0211】

キットは、プライマー、抗体、またはプローブである少なくとも1つの物質を含みうる。プライマーまたはプローブは、SEQ ID NO:1もしくはSEQ ID NO:2に示される核酸配列またはその変種もしくは断片に対して特異的でありうる。プライマーまたはプローブは、SEQ ID NO:7およびSEQ ID NO:8から選択されうる。プライマーまたはプローブは、以下からなる群の配列のいずれかから選択されうる。

30

(i) ACCTCATCAGCAGTGACCAGT (フォワードプライマー; SEQ ID NO:7) および
ACATCATCTTGGCTGCTATGG (リバースプライマー; SEQ ID NO:8); (ii) TGC CTC
GGG CAG CCT (フォワードプライマー; SEQ ID NO:9) および TTG GTC AAT CCG GAG
AGT CC (リバースプライマー; SEQ ID NO:10); (iii) gag gaa ttc atA TGG AGG CCT CTG CTC
TCA (ISG12f; SEQ ID NO:16) および cgc gaa ttc agC TAG TAG AAC CTC GCA ATG
(ISG12r; SEQ ID NO:17)

40

【0212】

キットは、生物試料中のIFI27遺伝子産物の存在を検出することができる多数の物質を含みうる。

【0213】

キットは、IFI27遺伝子配列によってコードされるポリペプチドまたはその抗原性断片もしくは変種に特異的に結合することができる抗体を含みうる。キットは、SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列、またはその抗原性断片もしくは変種を含むIFI27ポリペプチドに選択的に結合することができる抗体を含みうる。

【0214】

50

キットは、本発明の方法を正規化するための1つまたは複数の物質を含みうる。正規化のための物質は、GAPDHなどの構成的に発現される遺伝子産物を検出するための物質からなる群より選択されうる。たとえば、キットは、GAPDHヌクレオチド配列に選択的に結合することができる1つまたは複数の核酸配列を含みうる。GAPDHヌクレオチド配列に選択的に結合することができる1つまたは複数の核酸配列は、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、もしくはSEQ ID NO:16に示される配列、またはその任意の断片もしくは変種の1つまたは複数でありうる。

【0215】

キットは、IFI27遺伝子産物の既知濃度を含む1つまたは複数の校正された標準物質を含みうる。

10

【0216】

キットは、(i) 1つまたは複数の参照試料；(ii) 1つまたは複数の検出可能な部分；(iii) 固相支持体上にIFI27遺伝子産物を検出する物質を固定するための1つまたは複数の物体；(iv) 固相支持体材料；(v) 生物試料を採取および/または保存するための1つまたは複数の容器；(vi) 生物試料の調製に用いるための1つまたは複数の試薬；(vii) 核酸配列を増幅するための1つまたは複数の物質；および(viii) 生物試料中のIFI27遺伝子産物レベルを決定する方法におけるキットまたはその成分の使用説明書、からなる群より選択される1つまたは複数の追加の成分を含みうる。

【0217】

概して本発明のキットは、任意の数の追加の成分を含みうる。

20

【0218】

非制限的な例として、追加の成分は、細胞培養のための試薬、参照試料、緩衝液、標識、および検出アッセイを行うための書面での説明書を含みうる。

【実施例】

【0219】

ここから本発明を、本発明の範囲を決して制限すると解釈すべきではない具体的例を参照して記載する。

【0220】

実施例1：材料および方法

試験参加者

30

実験は、実験セットおよびバリデーションセットからなる試験試料に基づいて行った。実験セット(n=54)は、インフルエンザ感染症のための候補バイオマーカーを同定するために用いられた。これには、患者のいくつかのコホートが含まれた；インフルエンザ感染症(n=8)、細菌感染症(n=16)、非感染状態を有する重篤な患者(n=12)、および健康なボランティア(n=18)。バリデーションセット(n=33)は、実験セットから生成されたバイオマーカーを試験するために用いた。試験参加者は全員、書面での同意書を提出しており、試験参加者の詳細は表1に示す。

【0221】

(表1) 実験セットおよびバリデーションセットにおける個体の人口統計学および臨床特徴

40

	実験セット		バリデーション 対照セット セット			
	重度の インフルエンザ 肺炎	重度の 細菌性 肺炎	SIRS を 有する 患者	重度の インフルエンザ 肺炎	健康な ボランティア	
人口統計学						
人数	8	16	12	33	18	
年齢 (歳)	34.875±13.2	61.4±13.4	61.5±15.6	48±15	43±16	10
男性/女性	3/5	7/9	10/2	9/24	6/12	
重症度						
APACHE	18.5±6.5	19±6.2	16.66±4.5	23±7.9	NA	
死亡率	0	31.3	0	15.2	NA	
人工換気	100	93.8	75	90.9	NA	
透析	12.5	6.3	8.3	6.1	NA	
変力剤	62.5	56.3	16.7	3.0	NA	
同時罹患率 (%)						
高血圧症	2.5	31.3	58.3	36.3	16.6	20
心疾患	0	37.5	33.3	6.1	0	
糖尿病	12.5	12.5	25.0	18.2	0	
COPD	25.0	37.5	16.7	15.2	0	
癌	0	12.5	0	0	0	
合計 = 87						

(COPD、慢性閉塞性肺疾患；APACHE II、急性生理学的慢性健康評価スコア；SIRS、全身性炎症反応症候群。プラスマイナスの値は、平均値±標準偏差である)。

【 0 2 2 2 】

遺伝子発現分析

可能性がある候補マーカーに関してスクリーニングするために、インフルエンザ感染症が確認された個体の全血について、トランスクリプトームマイクロアレイ分析を行った。標準プロトコール (PAXgene (商標) Blood RNA kit - Qiagen, Germany) を用いてRNA抽出を行った。Agilent Bioanalyserを用いてRNAの品質を分析したところ、全ての試料が、高品質試料を示す6.5より大きいRNA完全性数値を有した。試料の増幅および標識は、Illumina TotalPrep増幅キット (Ambion, Austin, TX) を用いて、総RNA 200 ngについて一度に試料24個のバッチで行った。満足できる増幅が確実に得られるように、増幅されたcRNAをAgilent Bioanalyserを用いて評価した。

【 0 2 2 3 】

試料 (各試料あたり750 ng) をHT-12_v3_BeadChips上に直ちにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションおよび洗浄手順は、処理したアレイの各セットに関して同一であり、正規化後、有意なバッチ効果は同定されなかった。実験上のアーチファクトを最小限にするために、RNA抽出、試料の増幅および標識、ハイブリダイゼーションおよび洗浄、ならびにスキャニングは、1日の同じ時間に同じオペレーターが行った。マイクロアレイデータは全て、マイクロアレイ解析に最低限必要な情報 (MIAME) に従って、Gene Expression Omnibus (GEO) (GSE40012) において入手可能である。

【 0 2 2 4 】

分析前に、アレイ上の各プローブを、任意のさらなる分析に含めるために、少なくとも1つの試料において0.0050未満の検出p-値を必要とするフィルターに通した。Illumina HT 12アレイ上に存在するプローブ48,804個中、24,840個のプローブ (以降、遺伝子と呼ぶ) がこの基準を満たした。フィルタリングに合格した遺伝子をBRB ArrayToolsにロードし

て、分位点の正規化およびデータの対数変換を適用した。マイクロアレイ実験のバリデーションは、qRT-PCRを用いて、遺伝子のサブセットに関してGAPDHと比較して発現を測定することによって行われた。qRT-PCRとマイクロアレイ相対変化倍率を比較して得られたR二乗値は、0.67から0.83の範囲であり、2つの遺伝子発現プラットフォームのあいだの強い一致を示している。

【 0 2 2 5 】

全ての試料に対して、中央値未満であると定義される低い分散を有する遺伝子を、データセットから除外した。Benjamani and Hochberg False Discovery Rate (FDR) 法 (ライブラリマルチテスト) を用いる多重検定に関してP値を補正した。2つのクラスのあいだで異なるように発現されと思われる遺伝子に関して、カットオフとしてFDR 5%を用いた。

10

【 0 2 2 6 】

定量的リアルタイムPCR

定量的リアルタイムPCRを、実験試料セットおよびバリデーション試料セットにおける全ての試料について行った。Qiagen RNeasyミニキットによって製造元の説明書 (Qiagen, Germany) に従って総RNAを調製した。RNAの収量をUV吸収によって決定した。

【 0 2 2 7 】

第一鎖cDNAを、Mastercycler (登録商標) グラジエント5331 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) において、Superscript III、RNaseOut、Oligo (dT) およびランダムプライマー (Invitrogen) を用いて調製した。RT-PCR反応に関して、1試料当たり2個ずつ実験を行った。PCR反応量は、cDNA試料5 μ l、各プライマー1 μ l、POWER SYBR green PCRマスターミクス (Applied Biosystems) 12.5 μ l、およびRNアーゼフリー水5.5 μ lを含む25 μ lであった。PCR産物がイントロンに及ぶようにオリゴヌクレオチドプライマー (Sigma Aldrich) を設計して、UCSCインシリコPCRウェブサイト (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr7command?command=start>) 上で確認した。

20

【 0 2 2 8 】

IFI27の増幅のために用いられるプライマーは、

5'-ACCTCATCAGCAGTGACCAGT-3' (フォワード) (SEQ ID NO.: 7) および

5'-ACATCATCTTGGCTGCTATGG-3' (リバーズ) (SEQ ID NO.: 8)

30

であった。PCRサイクリング条件は：95 で10分間の保持、95 で30秒、64 で30秒、次に72 で30秒を5サイクル、95 で30秒、59 で30秒、次に72 で30秒を35サイクル、75

から99 での融解であった。IFI27の発現レベルを、ヒトハウスキーピング遺伝子、GAPDH

5'-ACGCATTTGGTCGTATTGGG-3' (フォワード) (SEQ ID NO.: 14) および

5'-TGATTTTGGAGGGATCTCGC-3' (リバーズ) (SEQ ID NO.: 15)

を用いて正規化した。アッセイは、Rotor-Gene 2000リアルタイムPCRマシン (Corbett Research, NSW, Australia) において行った。シングルPCR産物を、融解曲線分析と、エチジウムブロマイド染色2%アガロースゲル (Sigma-Aldrich) 上で泳動させてUV透視により可視化した場合の単一産物の観察との両方によって確認した。遺伝子発現データの可視化は、GraphPad PRISM (バージョン6) を用いて行った。

40

【 0 2 2 9 】

細胞培養

ヒト免疫細胞において行った実験に関して、10%ウシ胎児血清 (FBS; SAFC Biosciences, Victoria, Australia)、50 IU/mlペニシリン、50 μ g/mlストレプトマイシン、および2 mM L-グルタミンを添加したGibco RPMI 1640培地 (Life Technologies, Australia Pty Ltd) からなる培養培地を用いた。培養細胞は全て、5%CO₂の湿潤大気中で37 で維持した。

【 0 2 3 0 】

50

免疫細胞サブセットの単離

ヒト細胞タイプ（単球、NK細胞、B細胞、pDC、mDC、CD4⁺、CD8⁺ T細胞、および好中球）を、全末梢血単核球（PBMC）から精製した。

【0231】

PBMCを単離するために、全血35 mlを、50 ml Falconチューブ中でFicoll 15 mlにロードして、400 × gで20 で30分間、ブレーキをオフにして遠心分離した。界面に位置する白い層を、新しいFalconチューブに注意深く採取した。単離したPBMCを、Ca²⁺またはMg²⁺を含まないDulbeccoリン酸緩衝生理食塩液（DPBS；Lonza, Walkersville, MD, USA）によって2回洗浄した。有核細胞数を、クリスタルバイオレットによる染色によって決定した。

【0232】

単球は、EasySepヒト単球濃縮キット（負の選択-STEMCELL Technologies, Australia）を用いて、製造元の説明書に従って新鮮なヒトPBMCから単離した。キットは、CD+16単球の小さいサブセットを枯渇させる。細胞を、CD14-FITCによって蛍光染色して、フローサイトメトリーによって分析した。純度は常に92%より高かった。

【0233】

ナチュラルキラー（NK）細胞は、EasySepヒトNK細胞濃縮キット（負の選択-STEMCELL Technologies, Australia）を用いてヒトPBMCから単離した。キットは、非NK細胞を枯渇させることによってNK細胞を濃縮する。NK細胞の純度を、CD56-PE.Cy7およびCD3-FITCによる染色後、フローサイトメトリーによって測定した。純度は常に94%より高かった。

【0234】

B細胞を、ヒトB細胞濃縮キット（STEMCELL Technologies, Australia）を用いて、細胞分離（負の選択）によって>98%純度（CD19+）まで濃縮した。純度は常に90%より高かった。

【0235】

骨髄樹状細胞（mDC）は、骨髄樹状細胞単離キット（負の選択、Miltenyi Biotec. N.S. W., Australia）を用いてヒトPBMCから単離した。mDCを非mDCの枯渇によって単離した。非mDCを、ビオチンコンジュゲート抗体のカクテルによって間接的に磁気標識した後、二次標識試薬として抗ビオチンコンジュゲートマイクロビーズを添加した。磁気標識された非mDCを、これらの細胞をMACSカラム上に保持することによって枯渇させた。非標識mDCをカラムに通過させた。細胞を、CD 141 (BDCA-3)-FITC、CD1c (BDCA-1)-APCによって蛍光染色して、フローサイトメトリーによって分析した。純度は常に、90%より高かった。

【0236】

形質細胞様樹状細胞（pDC）は、EasySepヒト形質細胞様DC濃縮キット（負の選択-STEMCELL Technologies, Vic, Australia）を用いてヒトPBMCから単離した。キットは、非pDCを枯渇することによってPBMCからpDCを濃縮する。細胞をCD304 (BDCA-4)-APCおよびHLA-DR-PerCPiによって蛍光染色して、フローサイトメトリーによって分析した。純度は常に92%より高かった。

【0237】

単球由来樹状細胞（MDDC）（>90%CD14+）は、プラスチック接着細胞を採取することによって、またはPBMCをRosetteSep CD 14+濃縮キット（STEMCELL Technologies, Australia）によって処置することのいずれかによって得た。次に、単離された単球を、適した濃度の組み換え型ヒトIL-4およびGM-CSF（eBioscience, San Diego, CA, USA）を添加した完全培地中で6日間培養した。

【0238】

CD4⁺ T細胞は、製造元によって提供されたプロトコールに従って負の選択（STEMCELL Technologies, Australia）によって新たに単離した。CD3+/CD4⁺ T細胞の純度は、96%であった。

【0239】

CD8⁺ T細胞は、EasySep CD8濃縮キット（STEMCELL Technologies, Australia）を用いてCD8の負の選択によって単離した。CD3+/CD8⁺ T細胞の純度を、フローサイトメトリーに

10

20

30

40

50

よって確認した (>95%)。

【0240】

好中球は、凝固を防止するためにヘパリンを用いて、健康なドナーから得たヒト血液の全量10~20 mlから単離した。その後の段階は全て、4 または氷中で行った。血液を、2%デキストランT500 (Pharmacia) を有するHanks緩衝塩類溶液 (HBSS; Life Technologies, Victoria, Australia) によって1:1に希釈して、赤血球を沈降させるために30分間インキュベートした。上相を新しいチューブに移してFicoll-Paque (商標) PLUS (GE Healthcare, Australia) を用いて密度分画した。沈降物から好中球を回収して、単核球を界面から回収した。沈降物を新しいチューブに移して、RBC溶解緩衝液 (150 mM塩化アンモニウム、1 mM重炭酸カリウム、0.1 mM EDTA、pH 7.2) 中に再懸濁させた後、10%低エンドトキシンウシ胎児血清 (FBS) および抗生物質を添加したRPMI 1640によって洗浄した。典型的な回収率は、採取した血液1ミリリットルあたり好中球300万個から500万個であった。純度は92%より高かった。各実験前に好中球を単離して、直ちに使用した。

【0241】

マクロファージは、先に記載したように精製した健康な血液ドナーのPBMCから調製した。マクロファージを、10%仔ウシ胎児血清、2 mM L-グルタミン、および50 IU/mlペニシリン、および50 µg/mlストレプトマイシンを添加したRPMI 1640培地中で 1.5×10^6 個/ウェルの密度で、96ウェルプレート (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA) において、10 ng/mlマクロファージ-コロニー刺激因子 (M-CSF; R & D Systems) によって精製単球から作製した。2日目および5日目に、培地の半分を新しくして、6日目に、単球由来マクロファージを採取した。得られた細胞集団は、>90%のマクロファージを含んだ。

【0242】

免疫細胞の分離とFACS分析

細胞を、表2に示すように表面マーカーの異なる発現に基づいて分離した。各実験において、細胞 (> 10^4 個/試料) を培地に懸濁し、新しく単離した細胞 (細胞表面表現型) の純度を直ちに決定したか、またはフローサイトメトリーBD LSR-II (BD Biosciences) による後の分析のために1%パラホルムアルデヒド中で固定した。FlowJoソフトウェアプログラム (Tree Star, USA) を用いて分析を行った。

【0243】

(表2) 免疫細胞サブセットを精製するためにフローサイトメトリーのために用いた抗体

コンジュゲート抗体	クローンの名称	アイソタイプ	企業
CD1c (BDCA-1)-APC	L161	ms IgG1, κ	Biolegend
HLA-DR-PerCP	L243	ms IgG2a, κ	Biolegend
CD14-FITC	HCD14	ms IgG1, κ	Biolegend
CD56-PECy7	NCAM16.2	ms IgG2b, κ	BD Bioscience
CD4-FITC	SK3	ms IgG1, κ	BD Bioscience
CD8-PerCP	SK1	ms IgG1, κ	BD Bioscience
CD304-APC	AC144	ms IgG1	Miltenyi Biotec
CD45-PE	HI30	ms IgG1, κ	Biolegend
CD19-FITC	4G7	ms IgG1, κ	BD Bioscience
CD19-APC	HIB19	ms IgG1, κ	Biolegend
CD16-パシフィックブルー	eBioCB16	ms IgG1, κ	eBioscience
CD3-パシフィックオレンジ	UCHT1	ms IgG1, κ	BD Pharmingen

【0244】

細胞刺激アッセイ

単離された免疫細胞を、インターフェロン- α 、インターフェロン- β 、インターフェロン- γ 、インフルエンザウイルス抗原、toll様受容体 (TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、およびTLR9) のアゴニスト、ならびに生きたインフルエンザウイルス

(H1N1、H3N2、B型インフルエンザ)を含む内因性のリガンドによって刺激した。純粋な細胞集団を、10%FBS、2 mM L-グルタミン、50 IU/mlペニシリン、および50 µg/mlストレプトマイシンを含むRPMI 1640に、細胞 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個/mlの密度で懸濁した。異なる濃度の刺激物質がIFI27発現に及ぼす効果を決定するために、細胞を、培地中で表記の濃度の刺激物質と共に37 °Cで6、12、および24時間インキュベートした。全ての処置に関して、最適な刺激条件を定義するために、用量反応を行った。刺激の前後での細胞生存率を、トリパンブルー排除法 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) によって測定した。

【0245】

統計分析

2つの群の比較を、必要に応じて、対応のない両側のスチューデントt-検定またはノンパラメトリックマン・ホイットニーU検定を用いて計算した。多群比較は、必要に応じて、一元配置ANOVAまたはクラスカル-ウォリス検定を用いて計算した。遺伝子発現データは、健康な対照と比較した変化倍率として表記する (平均値 ± SD)。統計分析は全て、GraphPad Prismバージョン6 (GraphPad Software, La Jolla, CA) を用いて行った。p値は全て両側であり、有意性の閾値は $p < 0.05$ であると考えられる。

【0246】

実施例2: IFI27は重度のインフルエンザ感染症において高度に発現される

可能性がある候補マーカーをスクリーニングするために、インフルエンザ感染症が確認された患者の全血についてトランスクリプトームマイクロアレイ分析を行った。この分析により、重度のインフルエンザ感染症のマーカーとして、インターフェロン刺激遺伝子、インターフェロン誘導タンパク質27 (IFI27) が同定された (図1)。実験セットにおいて、IFI27遺伝子は、インフルエンザ感染症による重度の疾患を有する個体において高度に発現された。この知見をバリデーションセットにおいて確認した (図2)。

【0247】

IFI27発現レベルと疾患の重症度のあいだの相関を、2つの独立した遺伝子発現データセット (GSE17156、GSE21802) においてさらに検証したところ、IFI27発現は、感染症が無症候性である個体において最少であるが、感染症が症候性である個体では中等度に増加し、および感染症による重度の疾患を有する個体では有意に増加することが見いだされた (図3)。重度の疾患を発症した個体のコホートでは、より高い平均IFI27発現 (> 90倍の変化) は、人工換気を必要とする個体のより高い割合に関連した (表3)。

【0248】

(表3) 重度のインフルエンザ肺炎を有する患者におけるIFI27発現

コホート	個体数	人工換気 (%)	IFI27 発現 (変化倍率-平均値)
実験セット	n=8	8 (100%)	325
バリデーションセット	n=33	30 (91%)	97
独立セット (GSE21802)	n=10	4(40%)	58.7

【0249】

患者が重度の疾患から回復すると、IFI27発現はベースラインレベルに向かって戻った (図4および5)。重症度のバイオマーカーとして、IFI27は、他の全てのインターフェロン誘導遺伝子より優れていた。他の遺伝子と比較すると、IFI27は、インフルエンザ感染症によって引き起こされた軽度および重度の疾患のあいだで最大の発現の差を示した (図6)。

【0250】

インビトロ実験から、末梢血中のウイルス量が、IFI27発現と相関することが確認された。健康なボランティアから単離したPBMCを用いて、インフルエンザウイルスが、IFI27

遺伝子発現の用量依存的増加を引き起こすことが見いだされた（図7）。細胞を、抗ウイルス剤であるリン酸オセルタミビルによって処置すると、アップレギュレーションは消失した（図8）。

【0251】

実施例3：IFI27発現のメカニズム

IFI27発現のメカニズムを明らかにするために、内因性のリガンド（インターフェロン- α 、インターフェロン- β 、およびインターフェロン- γ ）を用いて末梢血細胞におけるインターフェロン経路を刺激する実験を行った。インターフェロン（IFN）は、IFI27発現の最大の増加を生じること（図9）およびこの増加は用量依存的に起こる（図10）ことが観察された。

10

【0252】

末梢血は、免疫細胞の不均一な混合物を含むことから、IFI27シグナルを生じる特異的免疫細胞サブセットを同定する段階を行った。toll様受容体（TLR）がIFN経路の主な活性化因子であることから、異なるTLRリガンドを血球に適用する影響を評価した。全てのTLRリガンドの中で、TLR7リガンドは最大のIFI27発現を生じることが見いだされた（図11）。TLR7は、概して形質細胞様樹状細胞（pDC）およびB細胞において主に見いだされ⁹、それゆえpDCまたはB細胞が、末梢血において観察されたIFI27シグナルの可能性のある起源であるという仮説を立てた。

【0253】

仮説を調べるために、8種類の免疫細胞サブセット（CD4⁺、CD8⁺、好中球、B細胞、単球、ナチュラルキラー細胞、骨髓様樹状細胞、および形質細胞様樹状細胞）を健康なボランティアの全血から精製した。加えて、インビトロで単球から分化した免疫細胞サブセット（単球由来マクロファージおよび単球由来樹状細胞）を作製した。これらの実験から、他の全ての細胞タイプと比較して、pDCが、TLR7リガンドに応答してIFI27遺伝子発現の最大の増加を生じることが示された（図12）。B細胞を含む他の免疫細胞サブセットは、最少のまたはごくわずかでIFI27シグナルを産生した。ウイルス抗原を用いたさらなる実験は、pDCが最大のIFI27アップレギュレーションを生じることを確認した（図13）。重要なことに、A型インフルエンザウイルス（H1N1およびH3N2）およびB型インフルエンザウイルスを用いて、全ての共通の季節性インフルエンザウイルス株がpDCにおいてアップレギュレートされたIFI27発現を引き起こすことが見いだされた（図14）。

20

30

【0254】

まとめると、上記の知見は、循環中のpDCが、感染した患者の全血において観察されるIFI27シグナルを生じること示唆した。この発現は、一本鎖RNAウイルスの非常に特異的な内因性受容体¹⁰であるTLR7受容体を介して媒介されうる。インフルエンザウイルスに曝露されると、TLR7の活性化が生じ得、その結果IFN経路を介して用量依存的IFI27アップレギュレーションが起こる（IFN- α の産生は、転写因子IRF7と複合体を形成するtollインターロイキン-1受容体ドメイン含有アダプターMyD88に依存的である）（図15）。

【0255】

実施例4：IFI27発現の経時的変化

IFI27発現の経時的変化を調べるために、pDCにおけるIFI27発現の縦断的分析を行った。pDCをインフルエンザウイルスに曝露して、IFI27遺伝子発現を4日間毎日測定した（図16）。この実験から、pDCが24時間以内にIFI27発現を急速に増加させた後、48および72時間で低下することが示された。遺伝子発現の低下は、アポトーシスアッセイによって証明される生存細胞数が48および72時間で比較的一定のままであることから（図16）、pDC数の減少によるものではなかった。この知見は、IFI27が感染の初期相において急速にアップレギュレートされることを証明した。

40

【0256】

実施例5：細菌感染症におけるIFI27発現

他の病原体（たとえば、細菌）も同様にIFI27発現を増加させるか否かもまた調べた。この目的のため、PBMCをリボ多糖類（LPS）と共に培養した。LPSは、無視できる程度の

50

IFI27遺伝子発現を引き起こすことが見いだされた(図17)。このことは、IFI27発現がインフルエンザ肺炎を有する患者と比較して有意に少ない細菌性肺炎患者のコホートにおいて確認された(図18)。これを、ウイルス性および細菌性肺炎の両方の患者(n=37)からなる独立したデータセット(GSE6269)においてさらに検証した。この場合も、この分析から、IFI27発現が、細菌性肺炎と比較してインフルエンザ感染症において有意に高いことが示された(図19)。

【0257】

実施例6：全身炎症におけるIFI27発現

重度の疾患は、宿主において全身性の炎症応答を誘発することから、重度の疾患が同様にIFI27発現を増加させるか否かを試験した。全身炎症反応症候群(外傷、肺炎、および高リスク手術によって引き起こされた)の患者のコホートにおいて、IFI27遺伝子発現は有意に増加しないことが見いだされた(図20)。このことは、IFI27発現が最少であるSIRS患者(n=167)の独立したデータセット(GSE11375)において確認された(図21)。

【0258】

実施例7：考察

インフルエンザのパンデミックは、感受性集団を通しての新規ウイルス株の急速な蔓延を特徴とする。大流行の際には感染者が指数的に増加することにより、疑われるあらゆる症例を検査および検疫することは論理的に不可能となる。公衆衛生の対応は、大流行の封じ込めから、最も重篤な個体への医療資源の割付へと急速にシフトするであろう。それゆえ、多数の感染者を迅速にトリアージできること、および悪化のリスクが高い個体を同定できることは、パンデミックの管理にとって極めて重要である。この目的に関して、IFI27は、インフルエンザ感染症に関連する信頼できる疾患重症度バイオマーカーとして確立されている。

【0259】

データは、IFI27が、インフルエンザ感染症による重度の疾患の3つの独立したコホートにおいて、疾患重症度と相関することを証明している。他のコホートにおけるさらなるバリデーションにより、IFI27がインフルエンザ感染症に対して特異的であることが確認された。さらに、一般的なインフルエンザウイルス株(H1N1、H3N2、B型インフルエンザ)の全てにおいて、IFI27発現の増加および有意なIFI27アップレギュレーションが起こることが見いだされており、これらはまた入院(>50倍の変化)または呼吸不全(>90倍の変化)にも関連している。まとめると、これらの知見は、IFI27発現が進行性の疾患を有する個体を同定するために有用な血液シグネチャーであり、貴重な臨床応用を有することを証明する。

【0260】

IFI27は、バイオマーカーとして好ましい動態プロファイルを有する。IFI27アップレギュレーションは、インフルエンザウイルスに対する曝露後24時間以内に急速に起こる。この特色は、医師が高リスク患者における処置の遅れを最小限にするために役立ちうる。2009年のH1N1インフルエンザのパンデミックの際に、進行性疾患を有する患者において、平均で5~7日の遅れが概ね報告された¹¹⁻¹³。IFI27は、患者が臨床的に悪化する前にこれらの患者を同定するために役立ちうる。

【0261】

これまで、パンデミックの大発生の際のリスク階層化は、公知の危険因子(たとえば、年齢、妊娠、肥満、または免疫抑制)に依存している。しかし、2009年のH1N1インフルエンザパンデミックの際の不釣り合いな程多数の感染患者は、同定可能な危険因子を有しなかった¹⁴。通常のウイルスアッセイは、原因となるウイルス株を同定することができる。しかし、それらは、疾患進行の主な決定因子である宿主応答に関する情報を提供しない。IFI27などの宿主応答バイオマーカーは、診断および宿主応答の両方に関する情報を提供することによって上記の限界を克服する。特に、本発明のデータは、IFI27が、疾患の重症度を反映するという点において、他の全ての公知のインターフェロン由来宿主応答バイオマーカー(たとえば、MxA、OAS)より優れていることを示している。

【0262】

宿主応答バイオマーカーの共通の限界は、その特異性の欠如である。たとえば、トリインフルエンザ（H5N1）感染症では、高レベルの炎症性サイトカイン（たとえば、TNF- α 、IL-6）は、疾患重症度のマーカーである¹⁵。しかし、同じバイオマーカーがまた、細菌性敗血症、外傷および手術を含む多くの非ウイルス疾患においても上昇している。この特異性の欠如は、これらのバイオマーカーが、多様な免疫細胞（たとえば、単球およびリンパ球）によって産生されるために起こる。これに対し、IFI27は、より病原体および細胞特異的である。この特異性は、おそらく一本鎖RNA（たとえば、インフルエンザウイルス）¹⁶のみを認識するTLR7-IFN- γ 経路による。重要なことに、この経路は現在、pDCに限って存在することが知られており、他の免疫細胞には存在せず、それゆえバイオマーカー文献において比類なき優れた診断特異性をIFI27に提供する。

10

【0263】

インフルエンザパンデミックと闘うための独自の難題は、新しいウイルス株の遺伝子構成が予測不可能に変化することである。IFI27などの宿主応答バイオマーカーは、おそらくこの難題を回避するであろう。本発明者らのデータは、IFI27発現が、パンデミックH1N1、季節性H3N2、およびB型インフルエンザを含む全ての一般的なインフルエンザ株によって増加することを示唆している。

【0264】

IFI27遺伝子は、細胞のミトコンドリア内膜に位置するタンパク質（ISG12）をコードする⁸。細胞または血清中IFI27タンパク質の測定は、インフルエンザ感染症を検出するための代替診断アプローチを提供しうる。一方、遺伝子発現アッセイは、IFI27発現を測定するためのより迅速で費用効果が高い手段を提供する。末梢血試料2.5 mlを得ることによって、IFI27発現レベルを、通常のRT-PCRによって数時間以内に迅速にアッセイすることができ、ルーチンの臨床実践において活性化pDCをモニターすることが実現可能である。

20

【0265】

本発明は重要な治療的および臨床的意味を有する。免疫学における最近の進歩により、樹状細胞が宿主応答の中心段階に存在し、pDCを含むいくつかの樹状細胞サブセットがウイルス感染症に対する免疫応答の多数のアームを協調させることが示されている^{17,18}。この複雑な樹状細胞のネットワークは、宿主防御にとって必須であるが、これはまた免疫病理学の起源でもありうる¹⁹。異常なpDC応答が、ウイルスの増殖を支持しうること、および致死性インフルエンザ感染症に関連することが、増えつつある証拠から示されている²⁰⁻²²。ウイルス感染症による重度の疾患と闘うために、樹状細胞を標的とする薬物が最近開発されている²³⁻²⁴。しかし、現在のところ、どの患者がpDC標的治療にとって適しているかを同定するために利用可能なアッセイはない。しかし、本明細書において、新規バイオマーカーとpDC応答および臨床重症度とを結びつける最初のデータが提供される。コンパニオン診断として応用すれば、IFI27発現はまた、pDC標的治療から恩典が得られうる患者のサブグループを同定するために役立つ。

30

【0266】

参考文献

1. Campbell A, et al. Risk of severe outcomes among patients admitted to hospital with pandemic (H1N1) influenza. *CMAJ*. 2010; 182(4): 349-55.
2. Bermejo-Martin J, Lejarazu R, Pumarola T, Rello J, Almansa R, Ramirez P, Martin-Loeches I: Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Crit Care* 2009; 13:R201.
3. Rasmussen UB, Wolf C & Mattei M-G et al. Identification of a new interferon α -inducible gene (p27) on human chromosome 14q32 and its expression in breast carcinoma. *Cancer Res*. 1993; 53: 4096–4101. 10
4. Bowcock AM, Shannon W & Du F et al. Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies. *Hum Mol Genet*. 2001; 10: 1793–1805.
5. Suomela S, Li Cao L, Bowcock A, & Saarialho-Kere U. Interferon α -Inducible Protein 27 (IFI27) is Upregulated in Psoriatic Skin and Certain Epithelial Cancers. *J. Invest. Dermatol*. 2004; 122, 717–721.
6. Nzeusseu Toukap A, Galant C, Theate I, Maudoux AL, Lories RJ, Houssiau FA, Lauwerys BR. Identification of distinct gene expression profiles in the synovium of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2007; 56(5):1579-88. 20
7. Smidt, KC, et al., *Biochim Biophys Acta*. 2003; Jul 30;1638(3):227-34
8. Gjermansen IM, Justesen J & Martensen PM. The interferon-induced gene ISG12 is regulated by various cytokines as the gene 6–16 in human cell lines. *Cytokine*. 2000; 12: 233–238.
9. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 2002; 168: 4531-7. 30
10. Diebold S, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Sousa C. Innate antiviral response by means of TLR7-mediated recognition of single-standed RNA. *Science*. 2004; 303: 1529-31.
11. Alonso-Tarres C, Cortes-Lletget C, Pintado S, Ricart A. Severe influenza A (H1N1)v in patients without any known risk factor. *Crit Care*. 2009; 13: 425.
12. To K, Hung I, Li I, Lee K, Koo C, Yan W, et al. Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection. *Clin Infect Dis*. 2010; 50: 850-9. 40

13. . Perez-Padilla R, de la Rosa-Zamboni D, Ponce de Leon S, Hernandez M, Quinones-Falconi F, Bautista E, et al. Pneumonia and Respiratory Failure from Swine-Origin Influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med*. 2009; **361**: 680-9.
14. WHO. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med*. 2010; **362**: 1708-19.
15. WHO. Current concepts: avian influenza (H5N1) infections in humans. *N Engl J Med*. 2005; **353**: 1374-85.
16. Rosebeck S, Leaman D. Mitochondrial localization and pro-apoptotic effects of the interferon-inducible protein ISG12a. *Apoptosis*. 2008; **13**: 562-72.
17. Steinman R. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol*. 2012; **30**: 1-22.
18. Satpathy A, Wu X, Albring J, Murphy K. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nature Immunology*. 2012; **13**: 1145-54.
19. Swiecki M, Collado M. Accumulation of plasmacytoid DC: roles in disease pathogenesis and targets for immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2010; **40**: 2085-130.
20. Soloff A, Weirback H, Ross T, Barratt-Boyes S. Plasmacytoid dendritic cell depletion leads to an enhanced mononuclear phagocyte response in lungs of mice with lethal influenza virus infection. *Comparative Immunology, microbiology and infectious diseases*. 2012; **35**: 309-17.
21. Langlois R, Legge K. Plasmacytoid dendritic cells enhance mortality during lethal influenza infection by eliminating virus-specific CD8 T cells. *J Immunol*. 2010; **184**: 4440-6.
22. Mecal M, Lewis G, Kunz S, Flavell R, Harker J, Zuniga E. Plasmacytoid dendritic cells are productively infected and activated through TLR-7 early after arenavirus infection. *Cell Host & Microbes*. 2012; **11**: 617-30.
23. Guiduci C, Coffman R, Barrat F. Signalling pathways leading to IFN- α production in human plasmacytoid dendritic cell and the possible use of agonists or antagonists of TLR7 and TLR9 in clinical indications. *J Intern Med*. 2008; **265**: 43-57.
24. Aldridge J, Moseley C, Boltz D, Negovetich N, Reynolds C, Franks J, et al. TNF/ iNOS -producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *PNAS*. 2009; **106**: 5306-11.

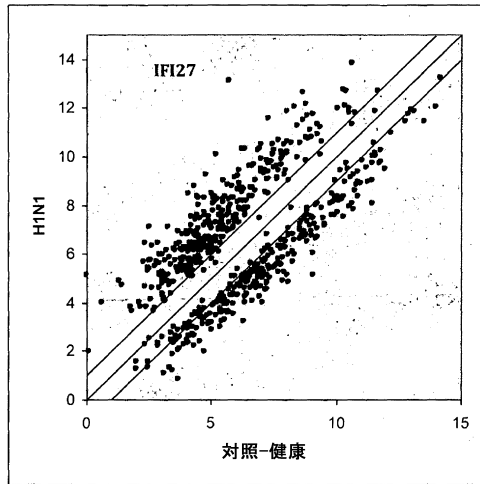
10

20

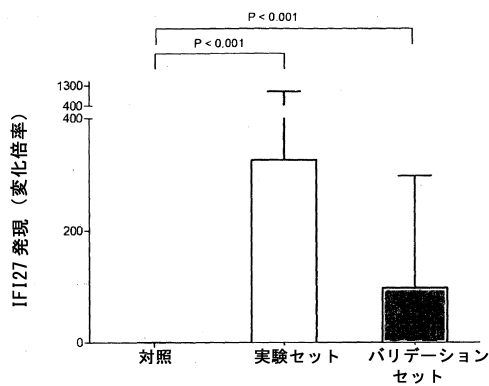
30

40

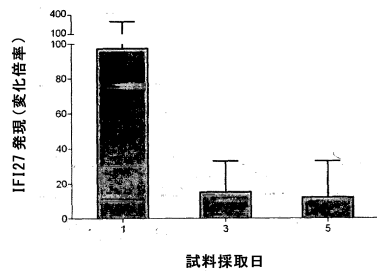
【図 1】



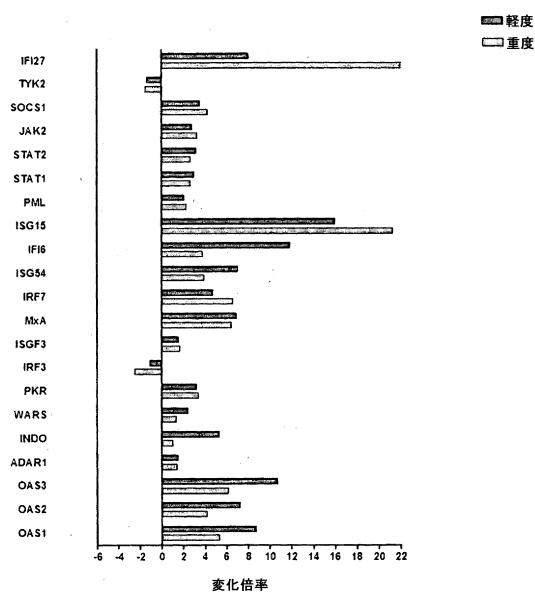
【図 2】



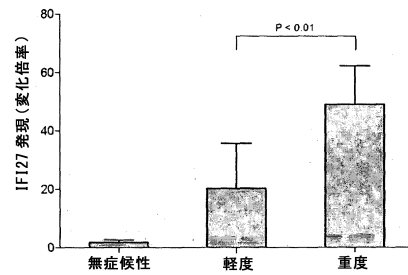
【図 5】



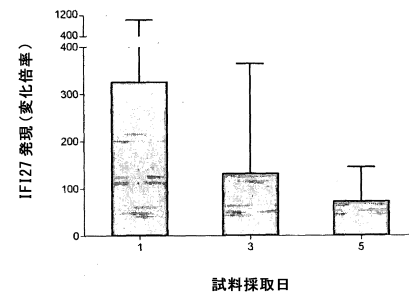
【図 6】



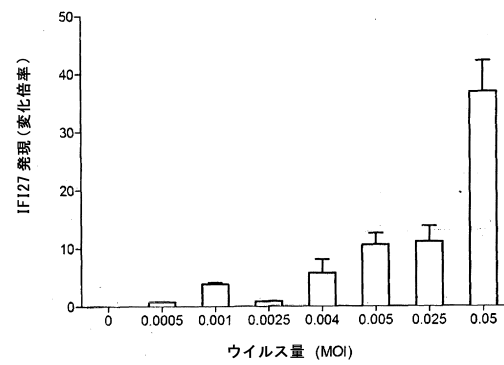
【図 3】



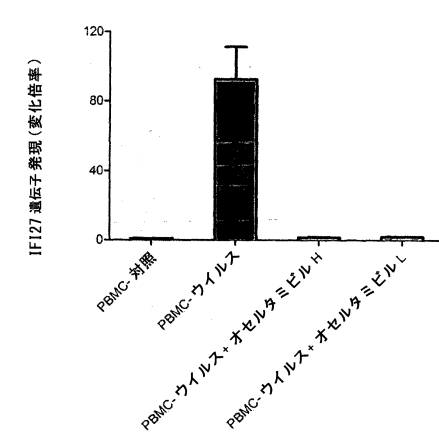
【図 4】



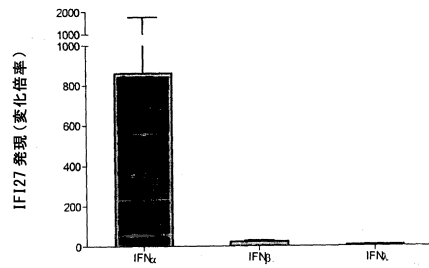
【図 7】



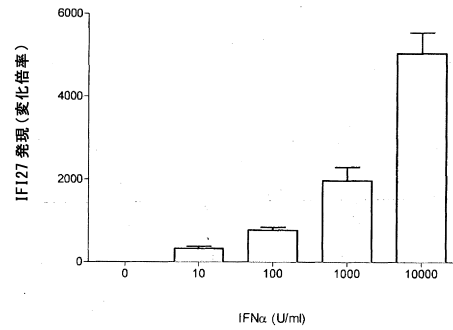
【図 8】



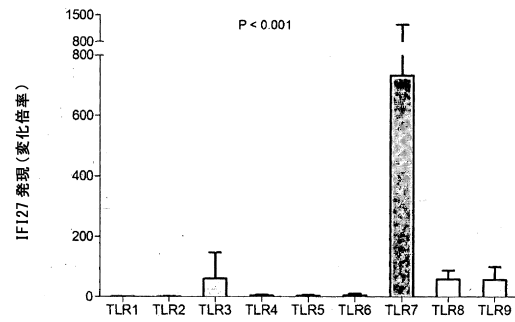
【図 9】



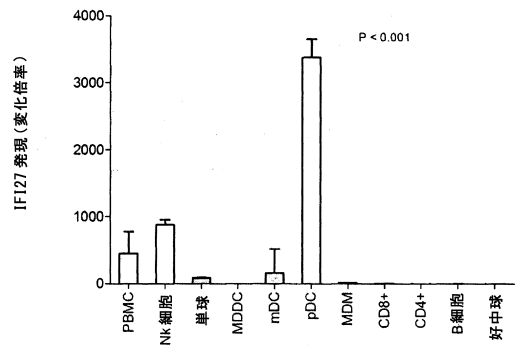
【図 10】



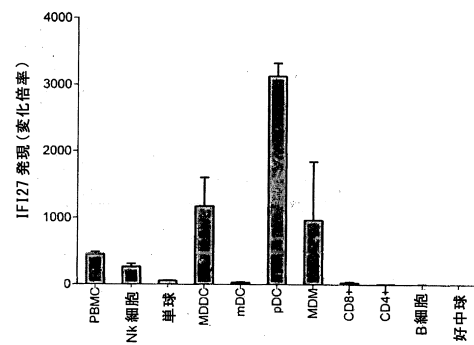
【図 11】



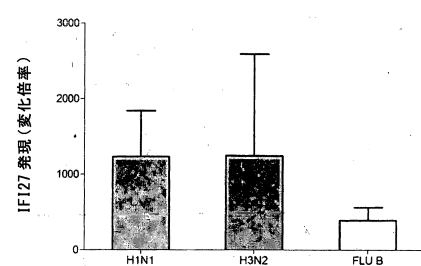
【図 12】



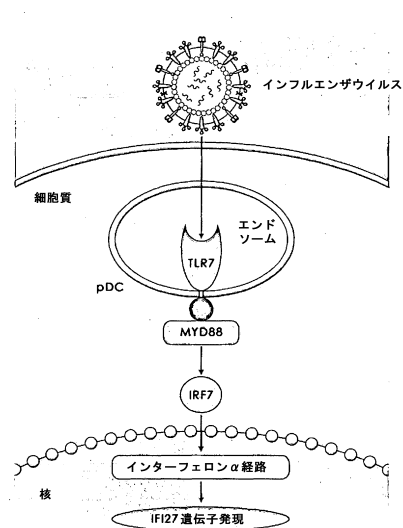
【図 13】



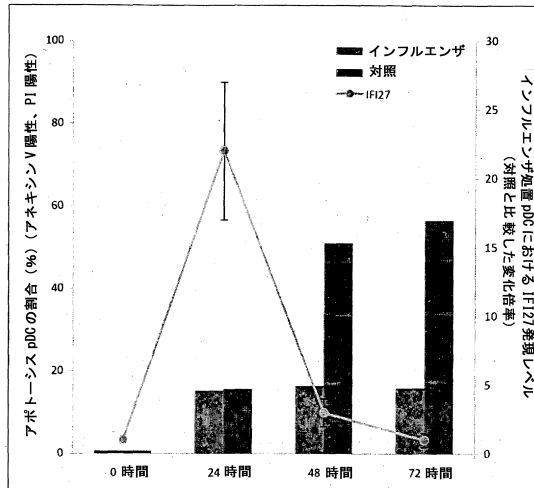
【図 14】



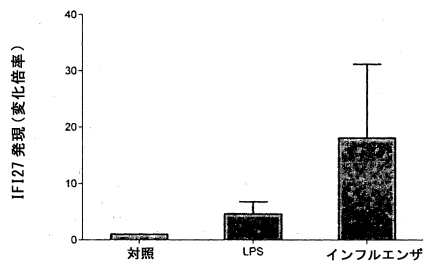
【図 15】



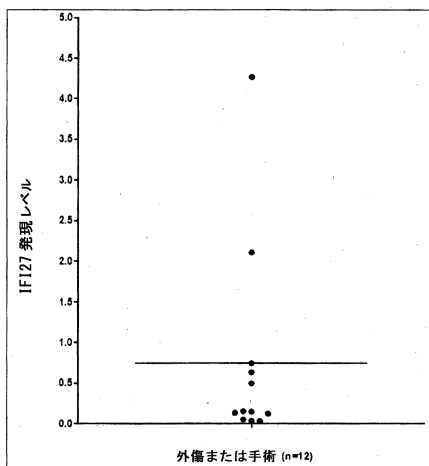
【図 16】



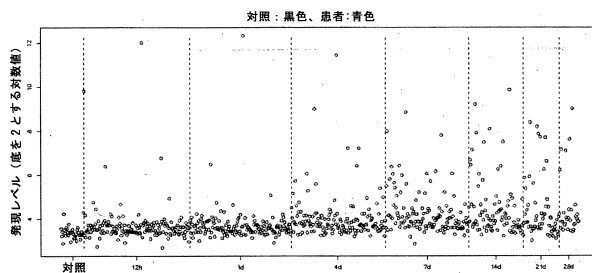
【図 17】



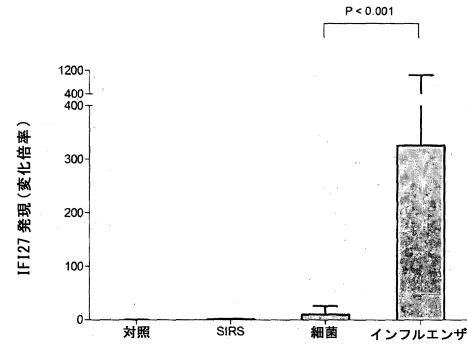
【図 20】



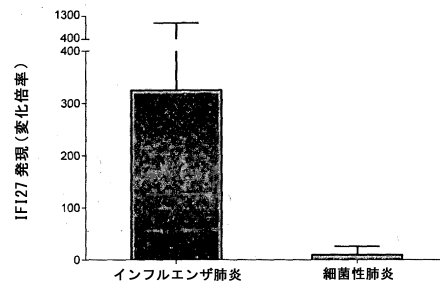
【図 21】



【図 18】



【図 19】



【図 22】

```

1  gggaacacat ccaagcttaa gacggtagg tcagcttcac attctcagga actctctctc
61  ttgggtctg gctgaagttg aggatctctt actctctagg ccacggaatt aaccggagca
121 ggcatggagg cctctgctct caccatcatca gcagtgacca gtgtggccaa agtgggcagg
181 gtggcctctg gctctgccgt agttttgccc ctggccagga ttgtacagat tgtgattgga
241 ggagttgttg ccatggcggc tgtgcccatg gtgtcagtg ccatgggctt cactggcgcg
301 ggaatgcctt cgtctccat agcagccaa atgatgtccg cggcgcccat tggcaatggg
361 ggtggaattg cctggggcag cctgtggctt actctcagat cactgggagc aactggactc
421 tcoggattga ccaagttcat cctgggctcc attgggtctg ccatggcggc tgcattgctg
481 aggttctact agtccctcgc cctgcgcctt gcagagaaga gaaccatgcc aggggagaag
541 gcacccagcc atctcgacc agcgaggagc caactatccc aaatatacct ggggigaat
601 ataccaaatt ctgcatctcc agaggaaaat aagaataaaa gatgaattgt tgcaactctt
661 caaaa

```

【図 23】

```

1  gggaacacat ccaagcttaa gacggtagg tcagcttcac attctcagga actctctctc
61  ttgggtctg gctgaagttg aggatctctt actctctagg ccacggaatt aaccggagca
121 ggcatggagg cctctgctct caccatcatca gcagtgacca gtgtggccaa agtgggcagg
181 gtggcctctg gctctgccgt agttttgccc ctggccagga ttgtacagat tgtgattgga
241 ggagttgttg cctgtgccat ggtgtcagt gccatgggct tcactggcg gcgaatcgcc
301 tctctctcca tagcagccaa gatgatgtcc cggcgccca ttgccaatgg ggtggaatt
361 gctctgggca gcctgtggc tactctgcag tcactgggag caactgactt ctcggattg
421 accaagtcca tctgtggctc cattgggtct gccattggcg ctgtcattgc gaggtctac
481 tagctccctg cctctgcccc tgcagagaag agaaccatgc caggggagaa ggcacccagc
541 catctcgacc cagcgaggag ccaactatcc caaatatacc tggggtgaaa tataccaaat
601 tctgcatctc cagagaaaaa taagaataaa agatgaattg ttgcaactct tcaaaa

```

【図 24】

```

MEASALTSSAVTSVAKVVRVASGSAVVLPLARIATVVIGGVAV
AAVPMVLSAMGFTAAGIASSSIAAKMMSAAAANGGVASGSLVATLQSLGATGLSG
LTKFILGSIGSIAAIVARFY

```

【図 25】

```

MEASALTSSAVTSVAKVVRVASGSAVVLPLARIATVVIGGVAV
PMVLSAMGFTAAGIASSSIAAKMMSAAAANGGVASGSLVATLQSLGATGLSGLTK
FILGSIGSIAAIVARFY

```

【 図 2 7 - 1 】

IFI27 の標的領域

ACCTCATCAGCAGTGACCAGTgtggccaaagtggtcagggtggcctctgg
ctctgccgtagtttggccctggccaggattgctacagtttgattggag
gagtttggtctgtgccatggtgctcagtgccatgggcttcaactgcggcg
ggaatgcctcgtcctCCATAGCAGCCAAAGATGATGT

GAPDH の標的領域 (ゲノム配列)

AATTGAGCCGCCGAGCCTCCGCTTCGCTCTCTGCTCTCCTGTTGCAC
 CTCACCGGCATCTGTTTTCGCTGCCAGCGTgaagacggggcgagagaaa
 gggagagcctataggagcagctgcgaagcgaggagggcgagcgagagag
 atgtgtctgcgcgcctgcgggggtggggccggcgagccttgagatctgaag
 ggcggggcgaggagagctgatctgcgcgcgcctgggcatcgagctctggg
 gggagggggggaggagagctgtgtgtgcgcgcggcgcaactaggcgctcact
 gctctctcctcccgagcagCGAGGCACATCGCTCAGACACATCGGGGA
 CGTGAAGTCGGAGTCAACGGTgagttgcgggtgctggggggggcctt
 ggctgcgacgcccgcgaacgcgctctacagacttgagggtctccggctc
 ttgcagctcgtatggggagagctgactgttcccgcgaaggagagctcaa
 ggtcagcctgcggagctgcggagcgcgcgaacccacccagctggcgccct
 tgcagctcccgcttgcggcgccactgcggcgagcctctctccctagt
 ccccgaaagcaggaggtctactcctccgcgcagatgcgcacccggagcc
 gcttgatggggagagcttctctcttcgcgctctgcggggctcaagtgtc
 gcagaggaggccctccccacggcctccggcacccgagccggccgggatgc
 tagtcggcagcgggctgtactctcttcggagctgcgcgctgcggtagag
 ggccgcagctgtgcacccagggaagaaatgaatggcgacgcctatgaaa
 gctctgcggtgactaacctgcgctctgctcgtatgggtggagtcgctg
 gtgcggggagatcaggtaggagcagctgagctggccgacttctctcct
 ggggtgagcttctctagatattctctctggtaatacaaaaggatgggtt
 .atggaggtgahcttgctccctcccgcagctgggtgtgtggctgtgga
 tgtgtcccaaggcgggagagactgagctagctaggtagttggaagagcaat
 tccagccaaaattggccctctcgtgggtgcgcctctctgcgcgcgcgc
 tcaactcaaggcccgccgctctccctccagcagctatagcttgaccgcacc
 caaaggccagctgtaaatgcacgcaggagagttgtgtctgggcgctt
 cgggaagactgcctctctcccatctcgcttccggaaacacagactccc
 accgcacccctctcgttaggttaataatagctgctgactctcttagag
 ggggctctgggctgggctctctccatctctctctctccccacacatgac
 ttaactgtctcccatcctgattcttgcgaagagagctaggaagagcag
 caacttgcacaaatacaagcctcggaactagggggttaaaatacagctccc
 cctctcccaacgcgcgcagctctgtctcccttttgtaggagagactaga
 gaagggggtgggtctgcctctgccagttaattcttgactcttctcctgcc
 ctttgatttgtatgctgtgagtgtacaagcgtcttctcctcaaaagggt
 cagctgagctagctgagcagcaagcatctctgggtggcgatagctgggggt
 tgaataccatgtacaagcttgtgccagactctgggggagcagctgcccca
 ctgcggcctcctcttgcgaagagcttgatgatactgggggtctgggcag
 ccttgagagctcagttgagacacatgcctaagcagccagcagctgcgcg

【 図 2 7 - 2 】

ggaagctcaaggagagataaaattcaacctcttgggccctctcgggggtaa
 gtagatgcctatctgcgcctcttaatggggagggcgccctagggctctga
 catatcttggaggagagccctccctctcatgcctcttgctccttgctctc
 tagATTGGTGGTATTTGGCGCCTGGTCACCGGGCTGCTTTAACTCTG
 GTAAAGTGGAATATTTGGTCATCAATGACGCCCTTCATGACCTTCAAG
 ATGtgtagctctacatggttagaccocaaagctggtgtgggagagcacac
 ttgctgatgggcagccctctataccctcaagtattcccccagGTTTACA
 GTTTCACAAATGTTCTACACCCATGGAAATTTCTATGGCACCCTCAAGGT
 GAGACGGGAACTGTTCTCAATGAAATCCCATCACCATCTTCCAGGA
 gtgagtgaagaacagaaatggaagaattgctcttgggtaggagcaactaga
 ttggtgtgctcccttggtgatattgtaaaccttgtgtctccctaaatagtgc
 ctctcccatctcccccccacccccctatgcGCGATCCCTCCAATATCA
 GTGGGGCATGCTGGCGCTGAGTACGTGTGGAGTGCACTGGCGTCTCA
 CCACCATGGAGAAGGCTGGGtgagtgcaggaaggcccccggagagggaa
 gctgaectcagccctgcaaaaggcaggacccgggttctaactctgtctctc
 tetctgctgctGCAATTTTCAGGGGGGAGCAAAAAGGCTCATGCTTCT
 CCCCCCTCTGCTGATGCCCCCATGTTCTGCTCATGGGTGTGAACCATGAGAAG
 TATTGACACAGCGCTCAACGATCATCAAGTGTgaggaaggcagggccctggag
 aaggcgacgctgcctgaagctatgagacacctctccctgactgcctgcgccct
 ctccctctttcttttgcagCAATGCTCTCTGCACACCAACTGCTTAGCAC
 CCTGGCCAAGGTCAATCATGACAACTTTGGTATCTGTGAAGACCAATCTG
 ctatgagagctgggaatctgcctagctaggctcccaacctcttctatccaaga
 ctgctctctccctgcggggctgctgcaacctcgggttggggttctg
 ggaagctgctttcccatcaattctcttaagctggggagagaggaatagag
 gtagtgtggggagtagctgcagggccctcaactctttgcagACCACTGA
 TCCATGCCATCATGCCACCCAGAAGACTTGGATGGCCCCCTCGGGAA
 TGTGGCGTATGATGGCCGGCGGCTCTCCAGACATCATCTCGGCTCTTAC
 TGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGCTCATCTCTGAGCTGAACGGGCAAG
 TCACTGGCATGGCCTTCGTCTGCCCATGCCAACGTGTCAGTGGTGGAC
 CTGACTCGCGCTAGAAAACACTGCCAAATATGTGATCATCAAGAGCT
 GTGAGAACGGCTCGGAGAGGCCCTCAACAGGCGATCTGGGCTACACTG
 AGCACCAAGTGTGTCTCTGACTTCAACAGGACACACCCATCTCTGCAC
 TTTCAGCTGGGGCTGGCATGCGCTCAAGACACACTTTGTCAAGTCAAT
 TTTCTGtgatgtgctggggcagggaatgggctcttaaaagtagcaggggt
 ctggcgccctctgggtgctgtgcagaagaaggctccctgacactcttt
 catctctatgATGATGACAAATTTGGTCACAGCAACAGGGGTGGTGAC
 TCACTGGCCGCATGGCCTCAAGGATTAAGCCCTGAGCCAGGACGCC
 CAGCAAGAGACACAGAGAGAGAGAGACCTTCACTGTGGGAGTGCTCT
 GCACACTCAAGTCCGCCACACACTGAACTCCCTCTCCACAGTTGCCA
 TGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCTAGGGAGCGCACCTTCTCATG
 TACCATTAATGAAGCTCTGTGCTCAACC

【 図 2 8 】

1 ggcctgggacct ggcctgagacct ggcgggaggcg ggggtccagcg tcaaccgcctg ccgcgcgcgcg
61 cccgggtttct ataaatttgag cccgcagacct cccgccttcgc tctctgctcc tctgttctga
121 cagtcagccg catctttctt tgcgtcgcca gcgcagccac atcgctcaga caccatgggg
181 aaggtgaagc tcggaagtcaa **cggaattggct cgtattggcg** gctctggtcac cagggctgct
241 ttaactctg gttaaagtga tattgtgcgc atcaatgacc ccttcattga cctcaactac
301 atggtttaca tgtccaata tgattccacc catggcaaat tccatggcac cgtcaaggct
361 gagaacygga agcttgtcat caatggaat cccatcacca tcttcacaga **cgcgagatccc**
421 **tccaaaaatca** agtggggcga tgctggcgct gagtactcgc tggagtccac tggcgctctc
481 accacacatg gaagagctcg ggctcatctc cagggggcgga ccaaaaggt catcatcttc
541 gcccccctcg atgagtcgcc ctgcttcgtc atgggtgtga aacctgaaga gtatgacaa
601 agcctcaaga tcatcagcaa tgcctcctgc accacacact gcttagaac cctggccaag
661 gtcatccatg acaactttgg tatcgtggaa ggaactcatg ccacagtcac tgccatcac
721 gccaccaga agactgtgga tggcccctcc gggaaactgt ggcgtgatgg ccgcggggct
781 ctcagaaca tcatcctgc ctctactgcg gctgccaaag ctgtgggcaa ggtcatcct
841 gactgaacg ggaagctcac tggcatggcc ttcctgtgcc ccactgccaa cgtgtcagt
901 tgggacctga cctgcctgtc agaaaacctc gccaaatatg atgacatcaa gaaggtgggt
961 aagcagcgtc cggaggggccc cctcaaggcg atcctgggct acactgagca ccaggtgtgc
1021 tctctgact tcaacagcga caccactccc tccaccttgg acgctggggc tggcattgcc
1081 ctaacagacc actttgtcaa gtcattttcc tggtagtaca acgaatttgg ctacagcaac
1141 agggtggtg acctcatggc ccacatggcc tccaaaggat aagaccctcg gaccaccagc
1201 cccaagaaga gcaacagagg aagagagaga cctcactgc tggggagtcc ctgccacct
1261 cagtcocccca cccactgaa tctccccttc tcaacattgc catgtagacc ccttgaagag
1321 gggagggggcg tagggagcgc cactctgtca tgtaccatca ataaagtaca ctctgtctcaa
1381 ccaaaaaaaa aaaaaaaa a a

【図 29】

1 gtgcgcagcg ggtgcatccc tgcccgatg ctgcgcctgc ggtagagcgg cgcgcattgt
61 gaaccgggga aggaatgaa tgggcagccg ttaggaaaac ctgcgcgtga ctaaccctgc
121 gctcctgcct cgatgggtgg agtcgcgtgt ggcggggaag tcaagtgag cgaggctagc
181 tggcccgatt tctcctccgg gtgatgcttt tcttagatta ttctctgatt tggtcgtatt
241 gggcgcctgg tcaccaggcg tgcttttaac tctggtaaag tggatattgt tgccatcaat
301 gaccocctca ttgacctcaa ctacatgggt tacatgttcc aatatgatcc caccocctgc
361 aaattccatg gcacogtcaa ggcctgagaac ggaagcttg tcatcaatgg aaatcccatc
421 accatcttcc aggagcgaga tcctccaaa atcaagtggg gcgatgctgg cgtgagtac
481 gtctgtgaggt ccactggcgt ctccaccacc atggagaagg ctggggctca ttgacaggga
541 ggagccaaaa gggtcacat ctctgcccc tctgctgatg ccccatgtt cgtcatgggt
601 gtgaaccatg agaagtatga caacagcctc aagatcatca gcaatgcctc ctgcaccacc
661 aactgcttag caccocctgc caaggctac catgacaact ttggtatcgt ggaaggactc
721 atgaccacag tccatgccat cactgccacc cagaagactg tggatggccc ctccgggaaa
781 ctgtggcgtg atggccgcgg ggcctccag aacatcatcc ctgcctctac tggcgtctgc
841 aaggctgtgg gcaaggtcat cctgagctg aacgggaagc tcaactggcat ggcttccgt
901 gtccccactg ccaactgtc agtgggtgac ctgaacctgc gtctagaaaa acctgccaaa
961 tatgatgaca tcaagaagg: ggtgaagcag gcgtcggagg gccccctcaa gggcatcctg
1021 ggctacactg agcaccaggt ggtctctct gacttcaaca gcgacacca ctctccacc
1081 tttagcgtg gggctggcat tgccctcaac gaccatttg tcaagctcat tctctggtat
1141 gacaacgaat ttgctacag caacaggggtg gtggacctca tggcccatat ggctccaaag
1201 gagtaagacc cctggaccac cagccccagc aagagcacia gaggaagaga gagaccctca
1261 ctgctgggga gtccctgcca cactcagtc cccaccacac tgaatctccc ctctccacg
1321 ttgcoatgta gacccttga agaggggagg ggcctagga gccgcacctt gtcatgtacc
1381 atcaataaag taccctgtgc tcaacaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

【配列表】

0006097388000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) G 0 1 N 33/15 Z
 C 1 2 N 15/00 A

(74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥

(72)発明者 マックリーン アンソニー
 オーストラリア ニューサウスウェールズ州 フォーコンブリッジ チャップマン パレード 2
 4 9

(72)発明者 タン ベンジャミン
 オーストラリア ニューサウスウェールズ州 グリーブ クック ストリート 1 2 / 2 9

(72)発明者 パーネル グラント ピーター
 オーストラリア ニューサウスウェールズ州 サマー ヒル リバプール ロード 1 3 / 4 9

(72)発明者 ショジャエイ マリアム
 オーストラリア ニューサウスウェールズ州 ウエストミード ブリッジ ロード 6 0 3 / 9 1
 シー

審査官 松岡 徹

(56)参考文献 特表 2 0 1 0 - 5 0 0 0 3 8 (J P , A)
 米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 1 4 6 6 1 (U S , A 1)
 Wanpo Zhang et al. , Avian influenza virus infection induces differential expression of
 genes in chicken kidney , Research in Veterinary Science , 2 0 0 8 年 , Vol.84 , pp.374-3
 81

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C 1 2 Q
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)