

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-539370

(P2024-539370A)

(43)公表日 令和6年10月28日(2024.10.28)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 Q	1/6851(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851	Z	2 G 0 4 5
C 1 2 Q	1/6837(2018.01)	C 1 2 Q	1/6837	Z	4 B 0 6 3
C 1 2 Q	1/6883(2018.01)	C 1 2 Q	1/6883	Z	4 C 0 8 5
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z	4 C 0 8 6
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全69頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-525930(P2024-525930)	(71)出願人	524161494
(86)(22)出願日	令和4年10月26日(2022.10.26)		レスピラディグム・プロプライエタリー・リミテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年5月29日(2024.5.29)		オーストラリア国 6 1 6 3 ウェスタン・オーストラリア, スペアウッド, ロッキンガム・ロード 1 / 2 3 5
(86)国際出願番号	PCT/AU2022/051283	(74)代理人	100118902
(87)国際公開番号	WO2023/070153		弁理士 山本 修
(87)国際公開日	令和5年5月4日(2023.5.4)	(74)代理人	100106208
(31)優先権主張番号	2021903424		弁理士 宮前 徹
(32)優先日	令和3年10月26日(2021.10.26)	(74)代理人	100196508
(33)優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア(AU)		弁理士 松尾 淳一
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く	(74)代理人	100163784
			弁理士 武田 健志
		(72)発明者	ボスコ, アンソニー
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 呼吸器感染リスクを決定するための方法

(57)【要約】

本発明は、呼吸器感染症に対する感受性を決定するための方法に関する。別の態様では、本発明は、個体が呼吸器感染症に対する感受性を増加させたかどうかを決定するための方法を提供し、本方法は、個体由来の臍帯血単核細胞(C B M C)をT L R 4アゴニストと接触させることと、C B M Cにおけるバイオマーカーの発現レベルを測定することと、を含み、T L R 4アゴニストと接触していないC B M Cと比較して、T L R 4アゴニストと接触したC B M Cにおけるバイオマーカーの差別的発現が、個体が呼吸器感染症に対する感受性を増加させたことを示す。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法であって、前記方法が、

- 前記個体由来の臍帯血単核細胞 (C B M C) を含むサンプルを T L R 4 アゴニストと接触させることと、

- 前記 C B M C におけるバイオマーカー K L H D C 7 B、I F N G、C A S Z 1、P S M B 9、P A R P 3、A C O T 7、N U B 1、U S P 1 8、N L R C 5、C C D C 1 9 4、G C H 1、P A R P 1 1、C X C L 1 1 及び P M A I P 1 の発現レベルを測定することと、を含み、

前記 T L R 4 アゴニストと接触していない C B M C と比較して、前記 T L R 4 アゴニストと接触した前記 C B M C におけるバイオマーカー K L H D C 7 B、I F N G、C A S Z 1、P S M B 9、P A R P 3、A C O T 7、N U B 1、U S P 1 8、N L R C 5、C C D C 1 9 4、G C H 1、P A R P 1 1、C X C L 1 1 及び P M A I P 1 の差別的発現は、前記個体が呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す、方法。

10

【請求項 2】

個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法であって、前記方法が、

- 前記個体由来の臍帯血単核細胞 (C B M C) を含むサンプルを T L R 4 アゴニストと接触させることと、

- 前記 C B M C におけるインターフェロンモジュールバイオマーカーの発現レベルを測定することと、を含み、

前記 T L R 4 アゴニストと接触していない C B M C と比較して、前記 T L R 4 アゴニストと接触した前記 C B M C におけるインターフェロンモジュールバイオマーカーの差別的発現は、前記個体が呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す、方法。

20

【請求項 3】

個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法であって、前記方法が、

- 前記個体由来の臍帯血単核細胞 (C B M C) を含むサンプルを T L R 4 アゴニストと接触させることと、

- 前記 C B M C における I R F 1 レギュロンによって調節される I F N モジュールバイオマーカーの発現レベルを測定することと、を含み、

前記 T L R 4 アゴニストと接触していない C B M C と比較して、前記 T L R 4 アゴニストと接触した前記 C B M C における I R F 1 レギュロンによって調節される I F N モジュールバイオマーカーの差別的発現は、前記個体が呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す、方法。

30

【請求項 4】

個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法であって、前記方法が、

- 前記個体由来の臍帯血単核細胞 (C B M C) を含むサンプルを T L R 4 アゴニストと接触させることと、

- 前記 C B M C におけるバイオマーカー K L H D C 7 B、I F N G、C A S Z 1、P S M B 9、P A R P 3、A C O T 7、N U B 1、U S P 1 8、N L R C 5、C C D C 1 9 4、G C H 1、P A R P 1 1、C X C L 1 1 及び P M A I P 1 の発現レベルを測定することと、

- 前記個体由来の前記バイオマーカーの前記発現レベルを参照データセットと比較することであって、前記参照データセットが、呼吸器感染症に対する感受性の増加を伴うか、又は伴わない 1 つ以上の個体に由来する T L R 4 アゴニストと接触した C M B C における同じバイオマーカーの発現レベルに関する情報を含む、比較することと、を含み、

参照データセットと比較して、前記個体における前記バイオマーカー K L H D C 7 B、

40

50

IFNG、CASZ1、PSMB9、PARP3、ACOT7、NUB1、USP18、NLRC5、CCDC194、GCH1、PARP11、CXCL11及びPMAIP1の前記発現レベルは、前記個体が呼吸器感染に対する感受性が増加していることを示す、方法。

【請求項5】

個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法であって、前記方法が、

- 前記個体由来の臍帯血単核細胞(CBMC)を含むサンプルをTLR4アゴニストと接触させることと、

- 前記CBMCにおけるインターフェロンモジュールバイオマーカの発現レベルを測定することと、 10

- 前記個体由来の前記バイオマーカの前記発現レベルを参照データセットと比較することであって、前記参照データセットが、呼吸器感染症に対する感受性の増加を伴うか、又は伴わない1つ以上の個体由来するTLR4アゴニストと接触したCBMCにおける同じバイオマーカの発現レベルに関する情報を含む、比較することと、を含み、

参照データセットと比較して、前記個体におけるインターフェロンモジュールバイオマーカの前記発現レベルは、前記個体が呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す、方法。

【請求項6】

個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法であって、前記方法が、 20

- 前記個体由来の臍帯血単核細胞(CBMC)を含むサンプルをTLR4アゴニストと接触させることと、

- 前記CBMCにおけるIRF1レギュロンによって調節されるIFNモジュールバイオマーカの発現レベルを測定することと、

- 前記個体由来の前記バイオマーカの前記発現レベルを参照データセットと比較することであって、前記参照データセットが、呼吸器感染症に対する感受性の増加を伴うか、又は伴わない1つ以上の個体由来するTLR4アゴニストと接触したCBMCにおける同じバイオマーカの発現レベルに関する情報を含む、比較することと、を含み、

参照データセットと比較して、前記個体における前記IRF1レギュロンによって調節されるIFNモジュールバイオマーカの前記発現レベルは、前記個体が呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す、方法。 30

【請求項7】

前記インターフェロンモジュールバイオマーカが、表3に列挙されているものである、請求項2又は5に記載の方法。

【請求項8】

前記IRF1レギュロンによって調節される前記IFNモジュールバイオマーカが、表4に列挙されているものである、請求項3又は6に記載の方法。

【請求項9】

前記方法が、機械学習アルゴリズムをバイオマーカの差別的又は絶対的発現に適用し、それによって、前記個体が呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す工程を更に含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項10】

前記機械学習アルゴリズムが、ランダムフォレスト解析である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記発現レベルが、差別的発現であり、前記差別的発現が、1.5倍を超える増加又は減少である、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記増加した感受性が、前記参照データセットと比較して、少なくとも1.10、少な 50

くとも 1.11、少なくとも 1.12、少なくとも 1.13、少なくとも 1.14、少なくとも 1.15、少なくとも 1.16、少なくとも 1.17、少なくとも 1.18、少なくとも 1.19、少なくとも 1.20、少なくとも 1.21、少なくとも 1.22、少なくとも 1.23、少なくとも 1.24、少なくとも 1.25、少なくとも 1.30、少なくとも 1.35、少なくとも 1.40、少なくとも 1.45、少なくとも 1.50、少なくとも 1.55、少なくとも 1.60、少なくとも 1.65、少なくとも 1.70、少なくとも 1.75、又は少なくとも 1.80 の相対リスク又はオッズ比である、請求項 4～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記個体が、1歳以下である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 14】

前記個体が、生後 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、2 週間、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、又は 1 歳である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記方法は、前記個体が約 2 歳、約 3 歳、約 4 歳、若しくは約 5 歳であるとき、又は 2 歳、3 歳、4 歳、若しくは 5 歳であるときに、呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記方法は、前記個体が少なくとも 5 歳であるときに、呼吸器感染症に対する感受性が増大していることを示す、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 17】

前記呼吸器感染症が、下気道感染症である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記呼吸器感染症が、細菌性又はウイルス性呼吸器感染症である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記ウイルス性呼吸器感染症が、インフルエンザ、パラインフルエンザ、コロナウイルス、アデノウイルス、メタニューモンウイルス、ライノウイルス、及び呼吸器合胞体ウイルス属の呼吸器感染症からなる群から選択され、好ましくは、前記ウイルス性呼吸器感染症が、ライノウイルス又は呼吸器合胞体ウイルス呼吸器感染症である、請求項 18 に記載の方法。

30

【請求項 20】

前記細菌性呼吸器感染症が、*Haemophilus Influenzae*、*Staphylococcus aureus* 又は *Moraxella* 属菌の呼吸器感染症である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記呼吸器感染症が、重度の下気道感染症である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

差別的な増加を伴う前記バイオマーカーが、IFI6、IFI27、RHEBL1、CDC194、BATF2、CARD16、IFIT1、ISG20、IFITM3、VAMP5、TNFSF13B、SAMD9、RNF213-AS1、IFIT2、XRN1、CD38、LRRN2 及び CDC194 以外の、表 3 及び 4 に列挙されているものである、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 23】

前記 CBMC が、少なくとも 4、6、12、18、又は 24 時間、前記 TLR4 アゴニストと接触しているか、又は接触した、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記バイオマーカーが、核酸又は増幅産物である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 25】

前記方法が、呼吸器感染症に対する感受性を低下させる治療を前記個体に施すことを更に含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記治療が、パリビズマブ、プレドニゾロン、オマリズマブ若しくはポリバクテリア製剤、又はそれらの任意の組み合わせである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記サンプルが、臍帯血である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記 C B M C が、臍帯血から精製される、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法 10

【請求項 29】

前記 C B M C が、B 細胞及び T 細胞、好ましくは、C D 4 + 及び / 又は C D 8 + T 細胞を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記 T 細胞が、C D 4 + セントラルメモリー T 細胞及び / 又は C D 8 + セントラルメモリー T 細胞である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

B 細胞及び T 細胞における前記バイオマーカの発現レベルが、前記 C B M C においてのみ測定される、請求項 29 又は 30 に記載の方法。 20

【請求項 32】

前記 C B M C が、C D 14 + 単球及び従来の樹状細胞 (c D C) 並びに任意選択で形質細胞様 D C (p D C) を更に含む、請求項 29 ~ 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記 T L R 4 アゴニストが、リポ多糖 (L P S)、モノホスホリル脂質 A (M P L A)、熱ショックタンパク質、S 100A8、S 100A9、RSV F タンパク質、フィブリノーゲン、ヘパリン硫酸又はその断片、ヒアルロン酸又はその断片、ニッケル、オポイド、1 酸糖タンパク質 (A A G)、アミノアキルグルコアミニド 4 - リン酸塩 (A G P)、R C - 529、マウス - ディフェンシン 2、及び完全フロイントアジュバント (C F A) からなる群から選択され、好ましくは前記 T L R 4 アゴニストが L P S である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 34】

前記 T L R 4 アゴニストが、細菌に由来し、任意選択で、前記 T L R 4 アゴニストが、細菌調製物中で精製されるか又は調製物中に含有される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記 T L R 4 アゴニストが L P S であり、かつ T L R 4 活性化を刺激する有効濃度で提供されており、好ましくは前記 L P S の濃度が 0 . 025 ng / ml ~ 100 ng / ml であり、より好ましくは前記 L P S の濃度が 1 ng / ml である、請求項 33 又は 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記 C B M C が、前記 T L R 4 アゴニストと接触する前に、 1×10^6 細胞 / ml で懸濁される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 37】

キット、パネル、又はマイクロアレイであって、バイオマーカ :

- K L H D C 7 B、I F N G、C A S Z 1、P S M B 9、P A R P 3、A C O T 7、N U B 1、U S P 1 8、N L R C 5、C C D C 1 9 4、G C H 1、P A R P 1 1、C X C L 1 1 及び P M A I P 1 ;

- 表 3 に列挙されているインターフェロンモジュールバイオマーカ ; 又は

- 表 4 に列挙されている I R F 1 レギュロンによって調節される I F N モジュールバイオマーカの各々に結合するか、又はそれらと個別に複合体を形成する診断試薬を含む、 50

キット、パネル、又はマイクロアレイ。

【請求項 38】

請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法に従って使用するための、又は使用する場合のキット、パネル、又はマイクロアレイであって、バイオマーカー：

- K L H D C 7 B、I F N G、C A S Z 1、P S M B 9、P A R P 3、A C O T 7、N U B 1、U S P 1 8、N L R C 5、C C D C 1 9 4、G C H 1、P A R P 1 1、C X C L 1 1 及び P M A I P 1；

- 表 3 に列挙されているインターフェロンモジュールバイオマーカー；又は

- 表 4 に列挙されている I R F 1 レギュロンによって調節される I F N モジュールバイオマーカーの各々に結合するか、又はそれらと個別に複合体を形成する診断試薬を含む、

10

キット、パネル、又はマイクロアレイ。

【請求項 39】

アッセイであって、

- 個体由来の臍帯血からの B 細胞及び T 細胞を T L R 4 アゴニストと接触させることと

、

- 前記 B 細胞及び T 細胞におけるバイオマーカー K L H D C 7 B、I F N G、C A S Z 1、P S M B 9、P A R P 3、A C O T 7、N U B 1、U S P 1 8、N L R C 5、C C D C 1 9 4、G C H 1、P A R P 1 1、C X C L 1 1 及び P M A I P 1 の発現レベルを測定することと、を含む、アッセイ。

【請求項 40】

20

アッセイであって、

- 個体由来の臍帯血からの B 細胞及び T 細胞を T L R 4 アゴニストと接触させることと

、

- 前記 B 細胞及び T 細胞におけるインターフェロンモジュールバイオマーカーの発現レベルを測定することと、を含む、アッセイ。

【請求項 41】

アッセイであって、

- 個体由来の臍帯血からの B 細胞及び T 細胞を T L R 4 アゴニストと接触させることと

、

- 前記 B 細胞及び T 細胞における I R F 1 レギュロンによって調節される I F N モジュールバイオマーカーの発現レベルを測定することと、を含む、アッセイ。

30

【請求項 42】

アッセイであって、

- 個体由来の臍帯血単核細胞 (C B M C) を T L R 4 アゴニストと接触させることと、

- 前記 C B M C におけるバイオマーカー K L H D C 7 B、I F N G、C A S Z 1、P S M B 9、P A R P 3、A C O T 7、N U B 1、U S P 1 8、N L R C 5、C C D C 1 9 4、G C H 1、P A R P 1 1、C X C L 1 1 及び P M A I P 1 の発現レベルを測定することと、を含む、アッセイ。

【請求項 43】

アッセイであって、

- 個体由来の臍帯血単核細胞 (C B M C) を T L R 4 アゴニストと接触させることと、

- 前記 C B M C におけるインターフェロンモジュールバイオマーカーの発現レベルを測定することと、を含む、アッセイ。

40

【請求項 44】

アッセイであって、

- 個体由来の臍帯血単核細胞 (C B M C) を T L R 4 アゴニストと接触させることと、

- 前記 C B M C における I R F 1 レギュロンによって調節される I F N モジュールバイオマーカーの発現レベルを測定することと、を含む、アッセイ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

本発明は、人生の初期段階で、呼吸器感染症、例えば、重度の下気道感染症に感染しやすいか、かかりやすいか、疾病素因を有するか、又は高いリスクを有する個体を特定するための方法に関する。これは、先制療法の形態での介入の機会を提供する。

【 0 0 0 2 】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年10月26日に提出されたオーストラリア仮出願第2021/903424号からの優先権を主張し、その全体の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【 背景技術 】

10

【 0 0 0 3 】

重度の下気道感染症 (s L R I) は、乳児及び小児における救急治療室受診の主な原因であり、喘息及び喘鳴の発症の主要な危険因子である。一連の前向き出生コホートからの研究は、s L R I と喘息との間の関連が、ライノウイルス (R V) 喘鳴及び早期の空中アレルギー感作を有する小児において最も強いことを見出した。しかしながら、R V は、顕著な症状がない場合、喘息の小児で日常的に検出され得、R V が s L R I の発症機序を駆動するのに必要であるが十分ではない可能性があることを示唆している。この点に関して、ウイルス検出と一致する、及び/又はそれに先行する、M o r e x e l l a、S t r e p t o c o c c u s、及びH a e m o p h i l i s種を含む細菌病原体の存在が、続く気道症状を著しく増幅させ、その後の喘息の発症のリスクを増加させることができることが実証されている。逆に、幼児期に微生物及びその産物に曝露することは、喘息を予防することも示されており、おそらく「ファーム効果」を通じて最も簡潔に説明されている。

20

【 0 0 0 4 】

いくつかの個体が幼小期においてs L R I及びその後の喘息に対してより感受性がある理由を決定する基礎となる免疫学的メカニズムは、よく理解されていない。

【 0 0 0 5 】

免疫系がまだ完全に発達していないときに、s L R Iに対する感受性が増加した個体、特に人生の初期段階の個体を特定する必要性が残っている。

【 0 0 0 6 】

本明細書における任意の先行技術への言及は、この先行技術が任意の管轄区域において一般的な一般知識の一部を形成すること、又はこの先行技術が当業者によって理解される、関連するとみなされる、及び/又は他の先行技術と組み合わせられることが合理的に予想されることができるとを承認又は示唆するものではない。

30

【 発明の概要 】

【 0 0 0 7 】

本発明は、複数の生物学的調節層 (トランスクリプトーム及びプロテオーム) にわたる刺激パネル (L P S、P o l y (I : C)、イミキモド) に対する臍帯血中の先天性免疫応答を特性化し、人生の初期段階におけるs L R Iのリスクに関連する先天性免疫応答パターンを特定するシステム生物学の手法を提供する。

【 0 0 0 8 】

40

別の態様では、本発明は、個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法を提供し、本方法は、

- 個体由来の臍帯血からのB細胞及びT細胞をT L R 4アゴニストと接触させることと

- C B M CにおけるバイオマーカーK L H D C 7 B、I F N G、C A S Z 1、P S M B 9、P A R P 3、A C O T 7、N U B 1、U S P 1 8、N L R C 5、C C D C 1 9 4、G C H 1、P A R P 1 1、C X C L 1 1及びP M A I P 1の発現レベルを測定することと、を含み、

T L R 4アゴニストと接触していないC B M Cと比較して、T L R 4アゴニストと接触したC B M CにおけるバイオマーカーK L H D C 7 B、I F N G、C A S Z 1、P S M B

50

9、PARP3、ACOT7、NUB1、USP18、NLRC5、CCDC194、GCH1、PARP11、CXCL11及びPMAIP1の差別的発現は、個体が呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す。

【0009】

任意の態様では、T細胞は、CD4+及び/又はCD8+T細胞であり得る。一実施形態では、CD4+T細胞は、セントラルメモリー細胞である。一実施形態では、CD8+T細胞は、セントラルメモリー細胞である。

【0010】

別の態様では、本発明は、個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法を提供し、本方法は、

- 個体由来の臍帯血単核細胞(CBMC)をTLR4アゴニストと接触させることと、
- CBMCにおけるバイオマーカーKLHC7B、IFNG、CASZ1、PSMB9、PARP3、ACOT7、NUB1、USP18、NLRC5、CCDC194、GCH1、PARP11、CXCL11及びPMAIP1の発現レベルを測定することと、

を含み、

TLR4アゴニストと接触していないCBMCと比較して、TLR4アゴニストと接触したCBMCにおけるバイオマーカーKLHC7B、IFNG、CASZ1、PSMB9、PARP3、ACOT7、NUB1、USP18、NLRC5、CCDC194、GCH1、PARP11、CXCL11及びPMAIP1の差別的発現は、個体が呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す。

【0011】

別の態様では、本発明は、個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法を提供し、本方法は、

- 個体由来の臍帯血からのB細胞及びT細胞をTLR4アゴニストと接触させることと、
- CBMCにおけるバイオマーカーKLHC7B、IFNG、CASZ1、PSMB9、PARP3、ACOT7、NUB1、USP18、NLRC5、CCDC194、GCH1、PARP11、CXCL11及びPMAIP1の発現レベルを測定することと、
- 個体由来のバイオマーカーの発現レベルを参照データセットと比較することと、

参照データセットが、呼吸器感染症に対する感受性の増加を伴うか、又は伴わない1つ以上の個体に由来するTLR4アゴニストと接触したCBMCにおける同じバイオマーカーの発現レベルに関する情報を含む、比較することと、を含み、

個体におけるバイオマーカーKLHC7B、IFNG、CASZ1、PSMB9、PARP3、ACOT7、NUB1、USP18、NLRC5、CCDC194、GCH1、PARP11、CXCL11及びPMAIP1の発現レベルは、参照データセットと比較して、個体が呼吸器感染に対する感受性が増加していることを示す。

【0012】

別の態様では、本発明は、個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法を提供し、本方法は、

- 個体由来の臍帯血単核細胞(CBMC)をTLR4アゴニストと接触させることと、
- CBMCにおけるバイオマーカーKLHC7B、IFNG、CASZ1、PSMB9、PARP3、ACOT7、NUB1、USP18、NLRC5、CCDC194、GCH1、PARP11、CXCL11及びPMAIP1の発現レベルを測定することと、
- 個体由来のバイオマーカーの発現レベルを参照データセットと比較することと、

参照データセットが、呼吸器感染症に対する感受性の増加を伴うか、又は伴わない1つ以上の個体に由来するTLR4アゴニストと接触したCBMCにおける同じバイオマーカーの発現レベルに関する情報を含む、比較することと、を含み、

個体におけるバイオマーカーKLHC7B、IFNG、CASZ1、PSMB9、PARP3、ACOT7、NUB1、USP18、NLRC5、CCDC194、GCH1、PARP11、CXCL11及びPMAIP1の発現レベルは、参照データセットと比

10

20

30

40

50

較して、個体が呼吸器感染に対する感受性が増加していることを示す。

【0013】

別の態様では、本発明は、個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法を提供し、本方法は、

- 個体由来の臍帯血からのB細胞及びT細胞をTLR4アゴニストと接触させることと、
- インターフェロンモジュールバイオマーカの発現レベルを測定することと、を含み、

TLR4アゴニストと接触していないB細胞及びT細胞と比較して、TLR4アゴニストと接触したB細胞及びT細胞におけるインターフェロンモジュールバイオマーカの差
10 異的発現は、個体が呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す。

【0014】

別の態様では、本発明は、個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法を提供し、本方法は、

- 個体由来の臍帯血単核細胞(CBMC)をTLR4アゴニストと接触させることと、
- インターフェロンモジュールバイオマーカの発現レベルを測定することと、を含み、

TLR4アゴニストと接触していないCBMCと比較して、TLR4アゴニストと接触
20 したCBMCにおけるインターフェロンモジュールバイオマーカの差異的発現は、個体が呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す。

【0015】

別の態様では、本発明は、個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法を提供し、本方法は、

- 個体由来の臍帯血からのB細胞及びT細胞をTLR4アゴニストと接触させることと、
- B細胞及びT細胞におけるインターフェロンモジュールバイオマーカの発現レベルを測定することと、

個体由来のバイオマーカの発現レベルを参照データセットと比較することであって、参照データセットが、呼吸器感染症に対する感受性の増加を伴うか、又は伴わない1つ
30 以上の個体に由来するTLR4アゴニストと接触したB細胞及びT細胞における同じバイオマーカの発現レベルに関する情報を含む、比較することと、を含み、

参照データセットと比較して、個体におけるインターフェロンモジュールバイオマーカの発現レベルは、個体が呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す。

【0016】

別の態様では、本発明は、個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法を提供し、本方法は、

- 個体由来の臍帯血単核細胞(CBMC)をTLR4アゴニストと接触させることと、
- CBMCにおけるインターフェロンモジュールバイオマーカの発現レベルを測定することと、

個体由来のバイオマーカの発現レベルを参照データセットと比較することであって、参照データセットが、呼吸器感染症に対する感受性の増加を伴うか、又は伴わない1つ
40 以上の個体に由来するTLR4アゴニストと接触したCBMCにおける同じバイオマーカの発現レベルに関する情報を含む、比較することと、を含み、

参照データセットと比較して、個体におけるインターフェロンモジュールバイオマーカの発現レベルは、個体が呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す。

【0017】

任意の態様では、インターフェロンモジュールバイオマーカは、表3に列挙されているものである。

【0018】

別の態様では、本発明は、個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうか
50

かを決定するための方法を提供し、本方法は、

- 個体由来の臍帯血からのB細胞及びT細胞をTLR4アゴニストと接触させることと、
- IRF1レギュロンによって調節されるIFNモジュールバイオマーカの発現レベルを測定することと、を含み、

TLR4アゴニストと接触していないB細胞及びT細胞と比較して、TLR4アゴニストと接触したB細胞及びT細胞におけるIRF1レギュロンによって調節されるIFNモジュールバイオマーカの差別的発現は、個体が呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す。

【0019】

別の態様では、本発明は、個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法を提供し、本方法は、

- 個体由来の臍帯血単核細胞(CBMC)をTLR4アゴニストと接触させることと、
- IRF1レギュロンによって調節されるIFNモジュールバイオマーカの発現レベルを測定することと、を含み、

TLR4アゴニストと接触していないCBMCと比較して、TLR4アゴニストと接触したCBMCにおけるIRF1レギュロンによって調節されるIFNモジュールバイオマーカの差別的発現は、個体が呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す。

【0020】

別の態様では、本発明は、個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法を提供し、本方法は、

- 個体由来の臍帯血からのB細胞及びT細胞をTLR4アゴニストと接触させることと、
- B細胞及びT細胞におけるIRF1レギュロンによって調節されるIFNモジュールバイオマーカの発現レベルを測定することと、
- 個体由来のバイオマーカの発現レベルを参照データセットと比較することと、
- 参照データセットが、呼吸器感染症に対する感受性の増加を伴うか、又は伴わない1つ以上の個体に由来するTLR4アゴニストと接触したB細胞及びT細胞における同じバイオマーカの発現レベルに関する情報を含む、比較することと、を含み、

参照データセットと比較して、個体におけるIRF1レギュロンによって調節されるIFNモジュールバイオマーカの発現レベルは、個体が呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す。

【0021】

別の態様では、本発明は、個体が呼吸器感染症に対して増加した感受性を有するかどうかを決定するための方法を提供し、本方法は、

- 個体由来の臍帯血単核細胞(CBMC)をTLR4アゴニストと接触させることと、
- CBMCにおけるIRF1レギュロンによって調節されるIFNモジュールバイオマーカの発現レベルを測定することと、
- 個体由来のバイオマーカの発現レベルを参照データセットと比較することと、
- 参照データセットが、呼吸器感染症に対する感受性の増加を伴うか、又は伴わない1つ以上の個体に由来するTLR4アゴニストと接触したCBMCにおける同じバイオマーカの発現レベルに関する情報を含む、比較することと、を含み、

参照データセットと比較して、個体におけるIRF1レギュロンによって調節されるIFNモジュールバイオマーカの発現レベルは、個体が呼吸器感染症に対する感受性が増加していることを示す。

【0022】

任意の態様では、バイオマーカの発現レベルは、発現の絶対レベル又は差別的レベルであり得る。

【0023】

任意の態様では、IRF1レギュロンによって調節されるIFNモジュールバイオマー

10

20

30

40

50

カーは、表 4 に列挙されているものである。

【 0 0 2 4 】

任意の態様では、本方法は、機械学習アルゴリズム、好ましくはランダムフォレスト解析を、バイオマーカーの発現の差別的発現又は絶対レベルに適用する工程を更に含み、それによって、個体が呼吸器感染症に対する感受性の高いリスクにあることを示す。

【 0 0 2 5 】

任意の態様では、個体は、1歳未満であるか、又は2歳以下である。任意の実施形態では、個体は、生後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1歳又は2歳である。任意の実施形態では、個体は、生後少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日、少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも1歳であるが、2歳以下である。任意の実施形態では、個体は、生後約1日～約7日、約1日～約2週間、約1週間～約6ヶ月、約1ヶ月～約6ヶ月、約1ヶ月～約3ヶ月、約6ヶ月～約1歳、約1ヶ月～2歳、約6ヶ月～2歳、約1歳～2歳である。

10

【 0 0 2 6 】

任意の態様では、この方法は、個体が約2歳、約3歳、約4歳、若しくは約5歳であるとき、又は2歳、3歳、4歳、若しくは5歳であるときに、呼吸器感染症に対する感受性の増加を決定する。任意の実施形態では、本方法は、個体が約2歳～約5歳、約2歳～約4歳、約2歳～約3歳、約3歳～約5歳、又は約4歳～約5歳であるときの呼吸器感染症に対する感受性の増加を決定する。

20

【 0 0 2 7 】

任意の態様では、この方法は、個体が少なくとも5歳であるときに、呼吸器感染症に対する感受性の増加を決定する。

【 0 0 2 8 】

任意の態様では、呼吸器感染症は、下気道感染症である。任意の態様では、呼吸器感染症は、細菌性又はウイルス性呼吸器感染症である。任意の態様では、呼吸器感染症は、重度の下気道感染症である。任意の実施形態では、ウイルス性呼吸器感染症は、ライノウイルス及び呼吸器合胞体ウイルス (RSV) を含み、細菌性呼吸器感染症は、Haemophilus Influenzae、Staphylococcus aureus、及びMoraxella属菌を含む。

30

【 0 0 2 9 】

いずれかの態様では、差別的発現は、1.5倍を超える増加又は減少である。任意の実施形態では、差別的減少を伴うバイオマーカーとしては、IFI6、IFI27、RHEBL1、CCDC194、BATF2、CARD16、IFIT1、ISG20、IFITM3、VAMP5、TNFSF13B、SAMD9、RNF213-AS1、IFIT2、XRN1、CD38、LRRN2及びCCDC194が挙げられる。任意の実施形態では、差別的な増加を伴うバイオマーカーとしては、IFI6、IFI27、RHEBL1、CCDC194、BATF2、CARD16、IFIT1、ISG20、IFITM3、VAMP5、TNFSF13B、SAMD9、RNF213-AS1、IFIT2、XRN1、CD38、LRRN2及びCCDC194以外の、表3及び4に列挙されているものを含む、本明細書に記載されるバイオマーカーが挙げられる。

40

【 0 0 3 0 】

別の態様では、本発明は、TLR4アゴニストで刺激されたCBMCにおけるバイオマーカーKLHC7B、IFNG、CASZ1、PSMB9、PARP3、ACOT7、NUB1、USP18、NLRC5、CCDC194、GCH1、PARP11、CXCL11及びPMAIP1の発現レベルを測定する方法を提供する。

【 0 0 3 1 】

別の態様では、本発明は、TLR4アゴニストで刺激されたB細胞及びT細胞、又はCBMCにおけるインターフェロンモジュールバイオマーカーの発現レベルを測定する方法

50

を提供する。

【 0 0 3 2 】

別の態様では、本発明は、T L R 4 アゴニストで刺激されたB細胞及びT細胞、又はC B M CにおけるI R F 1レギュロンによって調節されるI F Nモジュールバイオマーカの発現レベルを測定する方法を提供する。

【 0 0 3 3 】

別の態様では、本発明は、

- 個体由来の臍帯血からのB細胞及びT細胞をT L R 4 アゴニストと接触させることと

、
- B細胞及びT細胞におけるバイオマーカーク L H D C 7 B、I F N G、C A S Z 1、P S M B 9、P A R P 3、A C O T 7、N U B 1、U S P 1 8、N L R C 5、C C D C 1 9 4、G C H 1、P A R P 1 1、C X C L 1 1及びP M A I P 1の発現レベルを測定することと、を含む、アッセイを提供する。 10

【 0 0 3 4 】

別の態様では、本発明は、

- 個体由来の臍帯血からのB細胞及びT細胞をT L R 4 アゴニストと接触させることと

、
- B細胞及びT細胞におけるインターフェロンモジュールバイオマーカの発現レベルを測定することと、を含む、アッセイを提供する。 20

【 0 0 3 5 】

別の態様では、本発明は、

- 個体由来の臍帯血からのB細胞及びT細胞をT L R 4 アゴニストと接触させることと

、
- B細胞及びT細胞におけるI R F 1レギュロンによって調節されるI F Nモジュールバイオマーカの発現レベルを測定することと、を含む、アッセイを提供する。 20

【 0 0 3 6 】

別の態様では、本発明は、

- 個体由来の臍帯血単核細胞(C B M C)をT L R 4 アゴニストと接触させることと、

- C B M Cにおけるバイオマーカーク L H D C 7 B、I F N G、C A S Z 1、P S M B 9、P A R P 3、A C O T 7、N U B 1、U S P 1 8、N L R C 5、C C D C 1 9 4、G C H 1、P A R P 1 1、C X C L 1 1及びP M A I P 1の発現レベルを測定することと、を含む、アッセイを提供する。 30

【 0 0 3 7 】

別の態様では、本発明は、

- 個体由来の臍帯血単核細胞(C B M C)をT L R 4 アゴニストと接触させることと、

- C B M Cにおけるインターフェロンモジュールバイオマーカの発現レベルを測定することと、を含む、アッセイを提供する。 30

【 0 0 3 8 】

別の態様では、本発明は、

- 個体由来の臍帯血単核細胞(C B M C)をT L R 4 アゴニストと接触させることと、

- C B M CにおけるI R F 1レギュロンによって調節されるI F Nモジュールバイオマーカの発現レベルを測定することと、を含む、アッセイを提供する。 40

【 0 0 3 9 】

別の態様では、本発明は、T L R 4 アゴニストと接触されたC B M Cにおけるバイオマーカーク L H D C 7 B、I F N G、C A S Z 1、P S M B 9、P A R P 3、A C O T 7、N U B 1、U S P 1 8、N L R C 5、C C D C 1 9 4、G C H 1、P A R P 1 1、C X C L 1 1及びP M A I P 1の発現レベルを測定することを含む方法を提供する。

【 0 0 4 0 】

別の態様では、本発明は、T L R 4 アゴニストと接触されたB細胞及びT細胞、又はC B M Cにおけるインターフェロンモジュールバイオマーカの発現レベルを測定すること 50

を含む方法を提供する。

【0041】

別の態様では、本発明は、TLR4アゴニストと接触されたB細胞及びT細胞、又はCBMCにおけるIRF1レギュロンによって調節されるIFNモジュールバイオマーカの発現レベルを測定することを含む方法を提供する。

【0042】

任意の態様では、B細胞及びT細胞、又はCBMCは、少なくとも4、6、12、18又は24時間、TLR4アゴニストと接触しているか、又は接触した。

【0043】

任意の態様では、CBMCは、TLR4アゴニストと接触しているか、又は接触しており、次いで、B細胞及びT細胞における関連するバイオマーカの発現レベルのみが測定又は決定される。

【0044】

任意の態様又は実施形態では、バイオマーカは、タンパク質、核酸、例えばRNA、又は増幅産物である。バイオマーカが核酸又は増幅産物である場合、本方法は、遺伝子又はRNAの発現のレベル又は量を決定することを含む。好ましくは、バイオマーカは、遺伝子又は遺伝子のRNA転写物からのヌクレオチド配列を含む1つ以上の核酸である。

【0045】

本明細書に記載の任意の態様又は実施形態では、RNA又はその増幅産物を参照する場合、本発明はまた、場合によっては、対応するタンパク質(RNAから翻訳された)の存在、レベル、又は量を決定若しくは測定することを含む。

【0046】

本発明の任意の態様では、1つ以上のバイオマーカのレベル又は量は、RNAのレベル又は量であり得る。好ましくは、RNAがpre-mRNA又は成熟mRNAのうちのいずれか1つであり、RNAのレベル又は量に対する変化が、RNAシーケンシングを含む、本明細書に記載の任意の方法を使用して決定され得る。

【0047】

任意の態様では、本方法は、呼吸器感染症に対する感受性を低下させる治療を個体に施すことを更に含む。好ましくは、治療は、パリビズマブ、プレドニゾロン、オマリズマブ若しくはポリバクテリア製剤、又はそれらの任意の組み合わせである。

【0048】

任意の態様では、B細胞及びT細胞、又はCBMCは、臍帯血から精製されてもよい。あるいは、任意の態様では、B細胞及びT細胞、又はCBMCは、個体由来の臍帯血のサンプル中に存在し得る。任意の実施形態では、B細胞及びT細胞、又はCBMCは、本明細書でB細胞及びT細胞、又はCBMCをTLR4アゴニストと接触させることへのいかなる言及も、B細胞及びT細胞を含有する臍帯血、又はCBMC(例えば、未処置、全臍帯血又は未精製の臍帯血)をTLR4アゴニストと接触させることを含むように、臍帯血中に存在する。一実施形態では、臍帯血は、赤血球が枯渇していてもよい。一実施形態では、B細胞及びT細胞、又はCBMCをTLR4アゴニストと接触させるとき、赤血球は、存在しないか、又は顕著なレベルでは存在しない。別の実施形態では、赤血球は、正常なレベルで存在し、すなわち、それらは、臍帯血から枯渇していない。

【0049】

任意の態様では、CBMCは、リンパ球(T細胞及びB細胞)を含むか、又はリンパ球(T細胞及びB細胞)からなる。好ましくは、CBMCは、CD14+単球及び従来の樹状細胞(cDC)並びに任意選択で形質細胞様DC(pDC)を更に含む。任意の実施形態では、CBMCは、CD4+T細胞、CD8+T細胞、及びB細胞を含むか、又はそれらからなる。

【0050】

任意の態様では、TLR4アゴニストは、本明細書に記載されるいずれか1つである。

好ましくは、TLR4アゴニストは、細菌に由来する。より好ましくは、TLR4アゴニストは、LPSである。任意の実施形態では、LPSは、精製されてもよい。あるいは、LPSは、細菌調製物に含まれてもよい。

【0051】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の少なくとも2つの診断試薬を含むキット、パネル又はマイクロアレイを提供し、各試薬は、本明細書に記載の異なるバイオマーカーを特定する。一実施形態では、キットは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14個以上のバイオマーカーに結合するか、又はそれらと個別に複合体を形成する診断試薬を含む。一実施形態では、キットは、バイオマーカー：

- KLHC7B、IFNG、CASZ1、PSMB9、PARP3、ACOT7、NUB1、USP18、NLRC5、CCDC194、GCH1、PARP11、CXCL11及びPMAIP1；

- 表3に列挙されているインターフェロンモジュールバイオマーカー；又は

- 表4に列挙されているIRF1レギュロンによって調節されるIFNモジュールバイオマーカーの各々に結合するか、又はそれらと個別に複合体を形成する診断試薬を含み得る。

【0052】

別の態様では、本明細書に記載の少なくとも2つの診断試薬を含む、本発明の方法に従って使用するための、又は使用するときのキットが提供され、各試薬は、本明細書に記載の異なるバイオマーカーを特定する。一実施形態では、キットは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14個以上のバイオマーカーに結合するか、又はそれらと個別に複合体を形成する診断試薬を含む。一実施形態では、キットは、バイオマーカー：

- KLHC7B、IFNG、CASZ1、PSMB9、PARP3、ACOT7、NUB1、USP18、NLRC5、CCDC194、GCH1、PARP11、CXCL11及びPMAIP1；

- 表3に列挙されているインターフェロンモジュールバイオマーカー；又は

- 表4に列挙されているIRF1レギュロンによって調節されるIFNモジュールバイオマーカーの各々に結合するか、又はそれらと個別に複合体を形成する診断試薬を含み得る。

【0053】

本明細書で使用される場合、文脈が別途必要とする場合を除き、「含む(comprise)」という用語、並びに「含むこと(comprising)」、「含む(comprises)」、及び「含んだ(compri sed)」などの用語の変形は、更なる添加剤、成分、整数、又は工程を除外することを意図しない。

【0054】

本発明の更なる態様及び前の段落で説明された態様の更なる実施形態は、以下の説明から明らかになり、例として、添付の図面を参照して与えられる。

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1-1】マルチオミクスデータセットの次元削減である。(A)実験及び解析設計の概略表現である。(B)ベースラインCBMCサンプルの免疫表現型決定である。Y軸は、CBMCから特定された全細胞型の細胞型の割合を示す。スキャッタープロットは、95%CIの中央値を示している。(C)遺伝子発現(PCA)、サイトカイン(PCA)データセットのためのマルチレベル次元削減である。軸は、第1の(x)及び第2の(y)主成分又は正準変数によって占める総変動(%)の割合を示す。(D~E)第1の(上の行)及び第2の(下の行)の主成分の上部寄与特徴を示す垂直バープロット、又は対応する(上記の)次元削減プロットの交差検証された正準変数である。x軸は、絶対寄与(%) / 負荷を示し、赤は正 / 高を示し、青は負 / 低を示す。

【図1-2】同上。

【図 1 - 3】同上。

【図 2 - 1】差別的発現及びネットワーク解析によって特定されたインターフェロン及び炎症促進性遺伝子発現は、先天性 CBMC 応答を特性化する。(A ~ C; 左パネル)それぞれ、LPS、イミキモド、及び Poly (I : C) 応答について、マッチした刺激されていないサンプルと比較して、著しく上方制御された(右; 赤)及び下方制御された(左; 青)遺伝子を示すボルケーノプロットである。矢印は、上方制御及び下方制御された遺伝子の数を示す。(A ~ C; 右パネル)それぞれ、マッチした刺激されていない対照と比較して、CBMC LPS、イミキモド、及び Poly (I : C) 応答の著しく上方制御された遺伝子から過剰提示された経路である。(D ~ F)それぞれ、LPS、イミキモド、及び Poly (I : C) 応答のネットワーク解析 (WGCNA) から特定されたモジュールである。群は、上から下に表示されているように、図のキーの順序になっている。モジュールは、調整された t 統計量 (Limma / voom) によってプロットされ、中央値、第一四分位数及び第三四分位数、 $\pm 1.5 \times \text{IQR}$ 、並びに外れ値を示す。赤線(上の線)(調整された t 統計量 = 2)を上回る中央値を有するモジュールは、有意に上方制御されたとみなされ、青い線(下の線)(-2)を下回るモジュールは、有意に下方制御されたとみなされる。モジュールは、凡例と同じ順序で左から右にラベル付けされる。(G)それぞれの応答のためのインターフェロン及び炎症促進性モジュール中の遺伝子の数のバープロットである。(H)CBMC 応答モジュール遺伝子間のランク付けされた発現及び接続性のスピアマンの Rho 値を示すヒートマップである。各応答のインターフェロン及び炎症促進性モジュールからのメンバー遺伝子の発現は、他の応答からの同じ遺伝子の発現と相関した。全ての相関に関連付けられた p 値は、0.01 未満であった。

【図 2 - 2】同上。

【図 2 - 3】同上。

【図 3 - 1】IFN モジュール遺伝子接続性及び CBMC 応答のドライバー、並びに出生から 5 歳までである。(A)それぞれ、LPS、イミキモド、及び Poly (I : C) CBMC 応答 IFN モジュール接続性の密度プロットである。破線は、平均(ライトグレー)及び中央値(ダークグレー)を示す。リリーフォース (Liliefors) p 値 > 0.05 は、正規分散接続性を示す。(B ~ D; 左パネル)それぞれ、LPS、イミキモド、及び Poly (I : C) CBMC IFN モジュールの上位 20 の最も接続された遺伝子のネットワーク配線図である。ノードサイズは、ネットワーク全体の接続数(度)を表し、エッジは接続の強度を示す(赤いエッジ、すなわち暗い線、相関 > 0.8 を示す)。(B ~ D; 右パネル) LPS、イミキモド、及び Poly (I : C) CBMC IFN モジュールについて、VIPER 解析によって特定された上位 10 のマスターレギュレーターである。バープロットは、著しく活性化されている (NES > 2、赤線)又は不活性/阻害されている (NES < -2、青線)転写因子の正規化エンリッチメントスコア (NES) を示す。グレーの陰影は、調整された P 値が 0.05 未満であることを示す。(E) マッチした CBMC (i) 及び 5 歳時 PBMC (ii) サンプルからの上位 20 個の最も接続された臍帯血 LPS 誘導 IFN モジュール遺伝子のネットワーク配線図である。ネットワーク特性は上記と同じである(図 3 B ~ D)。(F) マッチした CBMC の臍帯血インターフェロンモジュール遺伝子接続性及び LPS 刺激に対する 5 歳時 PBMC 応答のネットワーク接続性密度プロットである。(G) マッチした CBMC (i) 及び 5 歳時 PBMC (ii、n = 9 有意ドライバー) サンプルについて特定された臍帯血インターフェロンモジュール遺伝子の上位の有意ドライバーである。バープロットの特性は上記と同じである(図 3 C)。(H 及び I) マッチした CBMC の臍帯血インターフェロンモジュール遺伝子接続性のネットワーク接続性密度プロット、及びイミキモド及び Poly (I : C) 刺激に対する 5 歳時 PBMC 応答のネットワーク接続性密度プロットである。

【図 3 - 2】同上。

【図 3 - 3】同上。

【図 4 - 1】LPS 誘導 IFN 遺伝子は、出生時の sLRI 感受性を予測する。(A) ランダムフォレスト分類器を、無作為に選択された 25 (50%) 人の被験者からの LPS

-、イミキモド、及び Poly (I : C) 誘導 IFN モジュール遺伝子で訓練し、残りの 25 (50%) 人の被験者について検証した。各 RF モデルは、各分割で使用される遺伝子の数及び成長した木の数に関して最適化した。プロットは、偽 (x 軸、1 特異性) 及び真 (y 軸、感度) 陽性率によって定義される受信者オペレーター特性 (ROC) 曲線下の面積を示す。 (B) 訓練 / 検証セット (50 / 50 ランダム割り当て) を 2 , 000 回リサンプリングすることによって、RF モデル予測を繰り返した。プロットは、各リサンプルの ROC 曲線下の面積を、中央値 (実線) 及び 95% CI (破線) で示す。 (C) LPS - (i)、イミキモド - (i i) 及び Poly (I : C) - (i i i) のネットワーク接続性密度プロットは、生後 1 年目に sLR I を記録した (オレンジ色 ; すなわち、より明るい線) 及び記録しなかった (灰色) 個体によって層別化された IFN モジュール遺伝子ネットワークを誘導する。 (D ~ E (i)) 乳児期に sLR I に耐性 (D (i)) 及び感受性 (E (i)) であった個体由来の CBMC サンプルからの LPS 誘導 IFN モジュール遺伝子ネットワークの上位 20 個の最も接続された遺伝子のネットワーク配線図である。ノードとエッジの特性は図 3 B と同じである。 (D ~ E (i i)) 乳児期に sLR I に耐性 (D (i i)) 及び感受性 (E (i i)) であった個体の CBMC LPS 誘導 IFN 応答モジュールについて、VIPER 解析によって特定された上位 10 のマスターレギュレーターである。パープロットの特性は図 3 C と同じである。 (F) 臍帯血 LPS 誘導 IFN モジュール固有遺伝子 (eigengene) の箱ひげプロットを、生後 1 年で sLR I を記録した (オレンジ色 ; すなわち、より明るい線) 及び記録しなかった (灰色) 個体によってグループ化した。ボックスは、中央値、第一四分位数及び第三四分位数、 $\pm 1.5 \times IQR$ 、並びに外れ値を示す ; P 値は、マン・ホイットニー U 検定によって決定される。 (G) 左から右への IFN モジュール固有遺伝子のプロットである。LPS (緑色 ; 1、2、7 及び 8 群)、イミキモド (青色 ; 3、4、9 及び 10 群)、並びに Poly (I : C) (赤色 ; 5、6、11 及び 12 群) の CBMC 応答は、乳児期に LR I 及び sLR I に耐性 (-) 及び感受性 (+) であった個体によってグループ化された。マン・ホイットニー U 検定によって決定された P 値及び有意な結果は、図 4 G を反映する。プロットは、中央値 (記号) 及び 95% CI (バー) を示す。

10

20

【図 4 - 2】同上。

【図 4 - 3】同上。

【図 4 - 4】同上。

30

【図 5 - 1】外部遺伝子発現データセットにおけるインビトロ CBMC 培養 IFN モジュール遺伝子の検証、LPS 誘導生物学的特徴のマルチオミクス統合、及び IRF 1 遺伝子発現相関である。 (A ~ C) ランダムフォレスト分類器を、刺激されていない及び LPS 又はイミキモド / Poly (I : C) CBMC 遺伝子発現データ (n = 50) について訓練し、予測に使用した : (A) 血液由来の遺伝子発現プロファイルからの健康な対照 (n = 52) からそれぞれ細菌 (n = 52) 及びウイルス感染症 (n = 92) で入院した小児 (17 歳未満)、 (B) PBMC サンプルからの回復期と比較して急性ウイルス性呼吸器感染症を表す乳児 (18 ヶ月未満 ; n = 15) 及び小児 (18 ヶ月 ~ 5 歳 ; n = 16) ; 並びに (C) 鼻由来の遺伝子発現プロファイルから検出可能な気道ウイルス感染症を有する (n = 193) 及び有さない (n = 105) 風邪様症状を有する喘息の小児 (6 ~ 17 歳)。プロットは、ROC 曲線下面積を示している。 (D) マルチオミクスデータ統合から決定される乳児期における sLR I 感受性のマルチレイヤーリスクプロファイルである。層間共発現が最大化され、正 (赤) 及び負 (青) の相関がそれぞれ ± 0.8 よりも強く示された。外周線は、生後 1 年で sLR I に抵抗性 (灰色) 又は感受性 (オレンジ色 ; すなわちより明るい線) であった個体からの特徴の相対的な発現を表す。入力データは、マッチした刺激されていないサンプルに関して調整した (ベースライン免疫表現型データを除く)。遺伝子名 (青色) と区別するために、転写因子 ID (緑色) に「 R _ 」を付加した。 (E ~ G) IFN 及び炎症促進性遺伝子 (G)、ウイルス関連受容体 (H)、及びケモカイン / サイトカイン (I) との LPS 誘導 IRF 1 遺伝子発現との関連性のプロットである。データは、マッチした刺激されていないサンプルに関して調整され、プロットは

40

50

、スピアマン (Spearman) の Rho 値 (記号) 及び 95% CI (バー、1000 ブートストラップ) を示す。赤色及び青色のデータポイント / ラベルは、BH 調整 FDR < 0.05 で、正及び負の相関 (それぞれ、0 を超えるか又は 0 未満の重複しない 95% 信頼区間) を表す。本明細書に開示及び定義された本発明は、本明細書又は図面から言及又は明らかにされた個々の特徴のうち 2 つ以上の全ての代替的な組み合わせに及ぶことが理解されよう。これらの異なる組み合わせの全ては、本発明の様々な代替的な態様を構成する。

【図 5 - 2】同上。

【図 6】(A) LPS に対する CBMC 応答の IFN モジュール内に含まれる遺伝子について、10 の選択された著しく過剰に表された経路 (InnateDB) である。(B) LPS CBMC 応答インターフェロンモジュールの元の VIPER プロット (モチーフ結合部位によるトリミング前) である。プロットは、(L - R) p 値、陽性 (右 ; 赤) 及び陰性 (左 ; 青) の相互作用、転写因子遺伝子名、活性化 (上部パネル ; 赤) 又は不活性化 / 阻害 (下部パネル ; 青) 状態 (NES)、並びに TF 遺伝子の相対的発現を示す。

10

【図 7】入力遺伝子が LPS 誘導 IFN モジュールに共通するそれらの遺伝子のみで制限される場合の、臍帯血 CBMC 応答の密度プロット及び推定されるドライバー解析 (前述のような) である。

【図 8】マッチした CBMC (左) 及び 5 年目の PBMC (右) サンプルの CBMC イミキモド (A) 及び Poly (I : C) (B) 誘導 IFN モジュールについてのドライバーである。

20

【図 9】それぞれ、CBMC LPS - (A)、イミキモド - (B)、及び Poly (I : C) 誘導 (C) IFN モジュールランダムフォレスト分類器について最も重要な遺伝子の上位 30 の遺伝子である。x 軸は、各変数を除くことにより、各モデルの精度損失を示す。

【図 10 - 1】(A、B) 訓練 / 検証セット (50 / 50 ランダム割り当て、2000 リサンプリング) を、一貫性を保ったままの各モデルの元の (最適化された) RF パラメータでリサンプリングすることによって、RF モデル予測を繰り返した。各リサンプルの密度としての AUC - ROC (A)。実線は、中央値の AUC - ROC を示し、破線は、上限及び下限の 95% 信頼区間を示す。これらの値は、以下の通りであった ; LPS : 中央値 = 0.619、 $CI^{lo} = 0.615$ 、 $CI^{hi} = 0.623$; イミキモド : 中央値 = 0.338、 $CI^{lo} = 0.335$ 、 $CI^{hi} = 0.341$; Poly (I : C) : 中央値 = 0.393、 $CI^{lo} = 0.389$ 、 $CI^{hi} = 0.397$ 。灰色の破線は、AUC - ROC が 0.5 (ランダムチャンス) であることを示す。(B) リサンプリングされた AUC - ROC 値は、箱ひげプロットとして表示される。マッチしたリサンプルの順列は、灰色の線で接続される。マッチしたリサンプル AUC - ROC 値は、全ての群間で有意に異なる (ウィルコクソン (Wilcoxon) SRT p 値 < 0.00001)。

30

【図 10 - 2】同上。

【図 11】(A) 乳児期に sLRI に抵抗性で感受性のある個体間の別個の接続性尺度 (スピアマンの Rho) を用いた評価によって確認された CBMC LPS 誘導 IFN モジュール差別的接続性である。(B、C) イミキモド誘導 (B) 及び Poly (I : C) 誘導 (C) IFN モジュール遺伝子ネットワークのネットワーク接続性密度プロットは、入力遺伝子を LPS 誘導 IFN モジュールに共通するもののみで制限し、生後 1 年目に sLRI を記録した (オレンジ色 ; すなわち、より明るい線) 及び記録しなかった (灰色) 個体によって層別化した。

40

【図 12】(A) 5 歳の喘息性 / 非喘息性の個体によってグループ化された、臍帯血 LPS 誘導 IFN モジュール固有遺伝子の箱ひげプロットである。(B) 臍帯血 LPS 誘導 IFN モジュール固有遺伝子の箱ひげプロットを、生後 5 年で喘鳴を有したか否かの個体によってグループ化した。

【図 13 - 1】(A) 熱性細菌及びウイルス感染症で入院した小児の血液由来遺伝子発現プロファイルの主成分解析である (GSE72809)。遺伝子発現データセットは、そ

50

れぞれ、利用可能な C B M C L P S 誘導遺伝子、イミキモド誘導遺伝子、及び P o l y (I : C) 誘導 I F N モジュール遺伝子に限定した。(B) それぞれ、C B M C L P S - 、イミキモド - 、及び P o l y (I : C) 誘導 I F N モジュールランダムフォレスト分類器について最も重要な遺伝子の上位 30 の遺伝子である。

【図 13 - 2】同上。

【図 14 - 1】(A ~ C) 生後 1 年における s L R I 感受性に関する I F N 及び炎症促進性メディエーター並びにウイルス関連受容体遺伝子の解析である。マッチした刺激されていないサンプルに関してデータを調整し、プロットは、乳児期の s L R I に対する耐性と比較して感受性である個体の C B M C データについてのマン・ホイットニー U 検定推定値及び 95% C I を示す。赤いデータポイント / ラベル (より暗いラベル) は、p 値が 0 . 05 未満の発現の増加を示す。(D) L P S で刺激された C B M C (n = 50) 中の I F I H 1 と I R F 1 / S T A T 1 との間のスピアマンの相関及び関連する p 値である。青い点線は、データの l o e s s フィットを表している。

10

【図 14 - 2】同上。

【図 15 - 1】L P S 処置した、又は L P S 処置していない臍帯血から採取されたリンパ系細胞を比較する単一細胞 R N A シーケンシング解析からの差別的遺伝子発現である。赤色に着色された遺伝子 (最も右の点線の右側に位置するより暗い点) は、上方制御されたとみなされ、青色に着色された遺伝子 (最も左の点線の左側に位置するより暗い点) は、下方制御されたとみなされる。

【図 15 - 2】同上。

20

【発明を実施するための形態】

【0056】

本明細書に開示及び定義された本発明は、本明細書又は図面から言及又は明らかにされた個々の特徴のうち 2 つ以上の全ての代替的な組み合わせに及ぶことが理解されよう。これらの異なる組み合わせの全ては、本発明の様々な代替的な態様を構成する。

【0057】

本発明の更なる態様及び前の段落で説明された態様の更なる実施形態は、以下の説明から明らかになり、例として、添付の図面を参照して与えられる。

【0058】

ここで、本発明の特定の実施形態を詳細に言及する。本発明は、実施形態と併せて記載されるが、意図は、本発明をそれらの実施形態に限定することではないことが理解されるであろう。むしろ、本発明は、特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内に含まれ得る全ての代替、修正、及び等価物を包含することが意図される。

30

【0059】

本発明は、喘息の続発に関連するウイルス感染症を含む、どの子供が早期に呼吸器感染症を経験するかを出生時に予測できる方法の開発に基づいている。本発明者らの知見は、生後 1 年における重度の呼吸器ウイルス感染症 (例えば、s L R I) に対する感受性が、抗細菌対抗ウイルス先天性免疫経路によって主に決定されることを示唆し、早期介入のために、リスクのある乳児の特定のための理論的根拠を提供する。これに関して、本明細書に提示されるデータは、病原性細菌に対する応答が、ウイルス刺激に対する応答よりも s L R I 感受性のより重要な決定要因であることを示唆する。

40

【0060】

本明細書に記載されている、増強された細菌媒介性 T L R 4 誘導 I F N 応答 / 出生時の遺伝子ネットワーク接続パターンが、乳児期におけるウイルス s L R I のリスクを付与した結果は、I F N 応答が急性ウイルス感染中にほぼ普遍的に保護的であることを考えると驚くべきものである。

【0061】

毎年、何千人もの子供たちが重度の呼吸器ウイルス感染症で救急科に搬送されている。重度のウイルス性下気道感染症 (s L R I) は、乳児及び小児の入院の主な原因であり、その後の喘息発症の主要な危険因子を構成する。

50

【 0 0 6 2 】

更に、これらの小児の一部は、世界中の3億人に影響を及ぼす気道の慢性炎症性疾患である喘息を発症する。特に、子宮内及び生後数年間の喘息の存在への軌跡は、免疫系が機能的に未熟であり、感染症の影響を受けやすい可塑性が高まる重要な期間を表している。乳幼児期における免疫系の可塑性は、免疫系を再プログラムし、疾患リスクを最小限に抑えるための免疫調節薬物の投与のための理想的な「絶好のチャンス」を提供する。本発明は、先天性免疫を調節し、重度の呼吸器ウイルス感染症及びその後の喘息の発症を低減又は予防するために適切な介入で治療することができる、高リスク乳児の非常に早期の特定を可能にする。

【 0 0 6 3 】

したがって、高リスクの乳児の早期特定は、これらの子供を免疫調節薬物で治療することを可能にし、これにより、重度の呼吸器ウイルス感染症及びその後の喘息の発症のリスクを最小限に抑える。重度の呼吸器ウイルス感染症による救急治療室受診の予防は、医療システムに数十億ドルを節約し、何百万人もの子供及びその家族の生活の質を向上させる。

【 0 0 6 4 】

総論

本明細書全体を通して、特に明記されていない限り、又は文脈が別途必要としない限り、単一の工程、物質の組成物、工程の群又は物質の組成物の群への言及は、それらの工程、物質の組成物、工程の群又は物質の組成物の群のうちの1つ及び複数（すなわち、1つ以上）を包含するように解釈されなければならない。したがって、本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が明示的に別様に示さない限り、複数の態様を含み、逆もまた同様である。例えば、「a」に対する参照は、単一のものだけでなく2つ以上を含み、「an」に対する参照は、単一のものだけでなく2つ以上を含み、「the」に対する参照は、単一のものだけでなく2つ以上を含むなどである。

【 0 0 6 5 】

当業者は、本発明が、具体的に記載されたもの以外の変形及び修正を受けやすいことを理解するであろう。本発明が全てのそのような変形及び修正を含むことを理解されたい。本発明はまた、本明細書で言及又は示される工程、特徴、組成物、及び化合物の全てを、個別に若しくは集合的に、並びに任意の及び全ての組み合わせ、又は当該工程又は特徴のうちの任意の2つ以上を含む。

【 0 0 6 6 】

当業者は、本発明の実施において使用され得る、本明細書に記載されるものと同様又は同等の多くの方法及び材料を認識するであろう。本発明は、決して、記載される方法及び材料に限定されるものではない。

【 0 0 6 7 】

本明細書で言及される全ての特許及び刊行物は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。

【 0 0 6 8 】

本発明は、例示のみを目的とする本明細書に記載される特定の実施例によって範囲が限定されるべきではない。機能的に等価な生成物、組成物、及び方法は、明らかに本発明の範囲内である。

【 0 0 6 9 】

本明細書における本発明の任意の実施例又は実施形態は、特に明記しない限り、本発明の任意の他の実施例又は実施形態に準用するものとする。

【 0 0 7 0 】

別途具体的に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、（例えば、細胞培養、分子遺伝学、免疫学、免疫組織化学、タンパク質化学、及び生化学において）当業者に一般に理解される意味と同じ意味を有すると解釈されなければならない。

10

20

30

40

50

【0071】

別段の指示がない限り、本開示で利用される組換えタンパク質、細胞培養、及び免疫学的技術は、標準的な手順であり、当業者に周知である。そのような技術は、J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)、T. A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)、D. M. Glover and B. D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996)、及び F. M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988、現在までの全ての更新を含む)、Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988)、及び J. E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (現在までの全ての更新を含む)などの情報源で文献全体を通して記載及び説明されている。

【0072】

「及び/又は」という用語は、例えば、「X及び/又はY」は、「X及びY」又は「X又はY」のいずれかを意味すると理解され、両方の意味又はいずれかの意味を明示的に支持するように解釈される。

【0073】

本明細書で使用される場合、「に由来する」という用語は、指定された整数が、必ずしもその供給減から直接ではないが、特定の供給源から取得されてもよいことを示すと解釈されなければならない。

【0074】

本明細書で使用される場合、TLR4アゴニストは、リポ多糖(LPS)、モノホスホリル脂質A(MPLA)、熱ショックタンパク質、S100A8、S100A9、RSVタンパク質、フィブリノーゲン、ヘパリン硫酸又はその断片、ヒアルロン酸又はその断片、ニッケル、オポイド、 α 1酸糖タンパク質(AAG)、アミノアキルグルコアミニド4-リン酸塩(AGP)、RC-529、マウス-ディフェンシン2、及び完全フロイントアジュバント(CFA)からなる群から選択されてもよい。

【0075】

本明細書に記載される「感受性」という用語は、特定の状態(例えば、特定の形質、表現型又は疾患)の発症、又は平均的な個体よりも特定の状態に抵抗することができない個体の傾向を指す。この用語は、感受性の増加及び感受性の低下の両方を包含する。したがって、本明細書に記載されるものを含む特定のバイオマーカーは、例えば、特定のバイオマーカーについて1を超える相対リスク(RR)又はオッズ比(OR)によって特徴付けられるように、呼吸器感染(例えば、sLRI)の感受性の増加(すなわち、リスクの増加)の特徴であり得る。あるいは、バイオマーカーは、1未満の相対的なリスクによって特徴付けられるように、呼吸器感染症(例えば、sLRI)の感受性の低下(すなわち、リスクの低下)の特徴である。

【0076】

感受性又はリスクの尺度は、本明細書でより詳細に説明されるように、相対リスク(RR)、オッズ比(OR)、及び絶対リスク(AR)などの尺度を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 7 】

ある特定の実施形態では、感受性の増加とは、少なくとも 1 . 1 0、少なくとも 1 . 1 1、少なくとも 1 . 1 2、少なくとも 1 . 1 3、少なくとも 1 . 1 4、少なくとも 1 . 1 5、少なくとも 1 . 1 6、少なくとも 1 . 1 7、少なくとも 1 . 1 8、少なくとも 1 . 1 9、少なくとも 1 . 2 0、少なくとも 1 . 2 1、少なくとも 1 . 2 2、少なくとも 1 . 2 3、少なくとも 1 . 2 4、少なくとも 1 . 2 5、少なくとも 1 . 3 0、少なくとも 1 . 3 5、少なくとも 1 . 4 0、少なくとも 1 . 4 5、少なくとも 1 . 5 0、少なくとも 1 . 5 5、少なくとも 1 . 6 0、少なくとも 1 . 6 5、少なくとも 1 . 7 0、少なくとも 1 . 7 5、及び / 又は少なくとも 1 . 8 0 の R R 又は O R の値を有するリスクを指す。1 よりも大きい他の整数以外の数値もまた、リスクを特徴付けることが可能であり、そのような数値もまた、本発明の範囲内である。

【 0 0 7 8 】

感受性の増加はまた、参照データセットとの比較を伴い得る。参照データセットは、(a) 呼吸器感染症 (例えば、s L R I) の増加した、上昇した、高い若しくはより高いリスク若しくは感受性であると決定された (増加した又は高リスクの参照データセットとも呼ばれる)、又は (b) 呼吸器感染症の増加したリスク若しくは感受性でないとして決定された (通常のリスク参照データセット又は増加したリスクなしの参照データセットとも呼ばれる) 1 つ以上の個体からのものであり得る。したがって、リスクが決定される個体由来のサンプル中のバイオマーカーの発現レベルが、増加又は高リスク参照データセットと同じであるか、又は有意差がある場合、その個体が呼吸器感染症の増加又は高リスクを有するという決定がなされ得る。あるいは、リスクが決定される個体由来のサンプル中のバイオマーカーの発現レベルが、増加又は高リスク参照データセットと有意差がある場合、その個体が呼吸器感染症の増加又は高リスクを有さないという決定がなされ得る。あるいは、リスクが決定される個体由来のサンプル中のバイオマーカーの発現レベルが、正常な又は増加したリスクなしの参照データセットと同じであるか、又は有意差がない場合、その個体が呼吸器感染症の増加又は高リスクを有さないという決定がなされ得る。あるいは、リスクが決定される個体由来のサンプル中のバイオマーカーの発現レベルが、正常な又は増加したリスクなしの参照データセットと有意差がある場合、その個体が呼吸器感染症の増加又は高リスクを有するという決定がなされ得る。

【 0 0 7 9 】

本発明の任意の方法又は使用において、決定は、呼吸器感染症 (例えば、s L R I) の増加、上昇、高い若しくはより高いリスク又は感受性であってもよく、あるいは決定は、呼吸器感染症の増加していない、上昇していない、より高くない若しくは正常のリスク又は感受性であってもよい。本明細書で使用される場合、呼吸器感染症の増加、上昇、高い若しくはより高いリスク又は感受性の決定への言及は、個体が先制療法の形態での介入を必要とするという決定への言及として解釈され得る。したがって、個体が先制療法の形態での介入を必要とするという決定がなされる本発明の任意の方法又は使用において、方法又は使用は、先制療法の形態での介入 (例えば、本明細書に記載される任意の先制療法) を施す工程を更に含む。

【 0 0 8 0 】

「タンパク質」という用語は、単一のポリペプチド鎖、すなわち、ペプチド結合によって連結された一連の連続したアミノ酸、又は互いに共有結合若しくは非共有結合した一連のポリペプチド鎖 (すなわち、ポリペプチド複合体) を含むものとする。例えば、一連のポリペプチド鎖は、好適な化学結合又はジスルフィド結合を使用して共有結合することができる。非共有結合の例としては、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力、及び疎水性相互作用が挙げられる。

【 0 0 8 1 】

「ポリペプチド」又は「ポリペプチド鎖」という用語は、前述の段落から、ペプチド結合によって連結された一連の連続したアミノ酸を意味すると理解される。

【 0 0 8 2 】

10

20

30

40

50

「マイクロアレイ」という用語は、基質上の結合 / 複合アレイ要素又はリガンド、例えば抗体の順序付けられた配置を指す。

【 0 0 8 3 】

「ポリヌクレオチド」という用語は、単数形又は複数形で使用される場合、一般に、修飾されていないRNA若しくはDNA、又は修飾されたRNA若しくはDNAであり得る、任意のポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドを指す。したがって、例えば、本明細書で定義されるポリヌクレオチドとしては、一本鎖及び二本鎖DNA、一本鎖及び二本鎖領域を含むDNA、一本鎖及び二本鎖RNA、並びに一本鎖及び二本鎖領域を含むRNA、一本鎖であってもよく、より典型的には二本鎖であってもよく、又は一本鎖及び二本鎖領域を含んでもよいDNA及びRNAを含むハイブリッド分子が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、RNA若しくはDNA、又はRNA及びDNAの両方を含む三本鎖領域を指す。「ポリヌクレオチド」という用語は、具体的には、cDNAを含む。この用語は、(cDNAを含む)DNA及び1つ以上の修飾塩基を含有するRNAを含む。一般に、「ポリヌクレオチド」という用語は、修飾されていないポリヌクレオチドの全ての化学的、酵素的、及び / 又は代謝的に修飾された形態、並びに単純及び複雑な細胞を含む、ウイルス及び細胞の特徴的なDNA及びRNAの化学的形態を包含する。

10

【 0 0 8 4 】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、一本鎖デオキシリボヌクレオチド、一本鎖又は二本鎖リボヌクレオチド、RNA : DNAハイブリッド、及び二本鎖DNAを含むが、これらに限定されない、20塩基未満の比較的短いポリヌクレオチドを指す。一本鎖DNAプローブオリゴヌクレオチドのようなオリゴヌクレオチドは、多くの場合、例えば、市販されている自動オリゴヌクレオチド合成器を使用して、化学的方法によって合成される。しかしながら、オリゴヌクレオチドは、インビトロ組換えDNA媒介技術を含む様々な他の方法によって、並びに細胞及び生物におけるDNAの発現によって作製することができる。

20

【 0 0 8 5 】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、ヒト、例えば哺乳動物を含む任意の動物を意味すると解釈されるべきである。例示的な対象としては、ヒト及び非ヒト霊長類が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、対象はヒトである。

30

【 0 0 8 6 】

サンプル

任意の態様では、B細胞及びT細胞、又はCBMCは、臍帯血から精製されてもよい。あるいは、任意の態様では、B細胞及びT細胞、又はCBMCは、個体由来の臍帯血のサンプル中に存在し得る。任意の実施形態では、B細胞及びT細胞、又はCBMCは、本明細書でCBMCをTLR4アゴニストと接触させることへのいかなる言及も、B細胞及びT細胞を含有する臍帯血、又はCBMC(例えば、未処置、全臍帯血又は未精製の臍帯血)をTLR4アゴニストと接触させることを含むように、臍帯血中に存在する。一実施形態では、臍帯血は、赤血球が枯渇していてもよい。一実施形態では、B細胞及びT細胞、又はCBMCをTLR4アゴニストと接触させるとき、赤血球は、存在しないか、又は顕著なレベルでは存在しない。別の実施形態では、赤血球は、正常なレベルで存在し、すなわち、それらは、臍帯血から枯渇していない。

40

【 0 0 8 7 】

任意の態様では、個体は、1歳未満であるか、又は2歳以下である。任意の実施形態では、個体は、生後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、2週間、1ヶ月、6ヶ月、1歳又は2歳である。任意の実施形態では、個体は、生後少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日、少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも1歳であるが、2歳以下である。任意の実施形態では、個体は、生後約1日~約7日、約1日~約2週間、約1週間~約6ヶ月、約1ヶ月~約6ヶ月

50

、約1ヶ月～約3ヶ月、約6ヶ月～約1歳、約1ヶ月～2歳、約6ヶ月～2歳、約1歳～2歳である。

【0088】

任意の実施形態では、臍帯血は、生後24時間以内の個体に由来する。任意の実施形態では、臍帯血は、生後48時間以内の個体に由来する。臍帯血を取得した後、本発明の方法で使用する前に最長で2年間凍結してもよい。例えば、臍帯血を取得し、本明細書に記載の本発明の方法に供される個体の現在の年齢以下の時間凍結してもよい。したがって、CBMCは、24時間以内若しくは48時間以内の新鮮な臍帯血、又は個体の出生から最長で2年間凍結された臍帯血から得てもよい。

【0089】

任意の実施形態では、臍帯血赤血球は、塩化アンモニウム溶解、密度勾配技法、低張溶解、免疫磁性細胞分離若しくは沈降、フローサイトメトリーソーティング、又は当業者によって理解される等価な方法によって枯濁される。

【0090】

任意の実施形態では、CBMCは、生理学的条件又はその付近で栄養培地中で培養される。例えば、CBMCは、37℃、5%CO₂で、RPMI+5%AB非熱不活性化血清中で培養してもよい。任意の実施形態では、CBMCは、非熱不活性化血清を含有する栄養培地中で培養される。

【0091】

任意の実施形態では、B細胞及びT細胞は、生理学的条件で、又はそれに近い生理学的条件で、栄養培地中で培養される。B及びT細胞培養培地は、当該技術分野において既知である。

【0092】

TLR4アゴニストによる刺激

本発明の任意の態様では、B及びT細胞、又はCBMC、又は臍帯血は、TLR4アゴニストで刺激されてもよい。

【0093】

B及びT細胞、又はCBMC、又は臍帯血を、TLR4アゴニストで少なくとも6時間、少なくとも12時間、少なくとも18時間、又は少なくとも24時間刺激してもよい。任意の実施形態では、CBMCを 1×10^6 細胞/mLで懸濁し、次いでTLR4アゴニストで刺激してもよい。

【0094】

任意の実施形態では、TLR4アゴニストは、TLR4活性化を刺激する有効濃度で提供される。有効濃縮物の例は、0.025ng/mL～100ng/mL、好ましくは1ng/mLのLPSである。他のTLR4アゴニストについて、有効濃度は、1ng/mLのLPSと同じTLR4の活性化をもたらす任意の量である。当業者であれば、本明細書に記載されるように、TLR4活性化を刺激する任意のTLR4アゴニストの有効濃度を決定するために使用され得る方法も認識するであろう。例えば、当業者は、任意のTLR4アゴニストの有効濃度に対するアッセイを行ってもよい。例示的なアッセイは、TLR4アゴニストを用いてインピトロでB細胞及びT細胞、CBMC又は臍帯血を一晩刺激することと、それぞれ、刺激されていないB細胞及びT細胞、CBMC又は臍帯血と比較して、NK-B媒介転写活性を測定することと、を含み、NK-B媒介転写活性の増加は、TLR4アゴニストの有効濃度を示す。

【0095】

バイオマーカーの検出及び測定

サンプル中のバイオマーカーは、当該技術分野で既知の任意の好適な方法によって測定することができることが理解される。バイオマーカーの発現レベルの測定は、直接的又は間接的であり得る。例えば、RNA又はタンパク質の存在レベルを直接定量することができる。あるいは、バイオマーカーの量は、cDNA、増幅されたRNA若しくはDNAの存在レベルを測定することによって、又はバイオマーカーの発現レベルを示すRNA、タ

10

20

30

40

50

ンパク質、若しくは他の分子の量又は活性を測定することによって、間接的に決定することができる。

【0096】

一実施形態では、バイオマーカーの発現レベルは、バイオマーカーのポリヌクレオチドレベルを測定することによって決定される。特定のバイオマーカー遺伝子の転写物のレベルは、サンプル中に存在するmRNA又はそれに由来するポリヌクレオチドの量から決定することができる。ポリヌクレオチドは、マイクロアレイ解析、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、ノーザンブロット、遺伝子発現の連続解析(SAGE)、総RNAシーケンシング、mRNAシーケンシング、キャップ解析遺伝子発現(CAGE)シーケンシング、シングルセルRNAシーケンシング、又はNanoString nCounterが挙げられるが、これらに限定されない、様々な方法によって検出及び定量化され得る。例えば、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、Draghici Data Analysis Tools for DNA Microarrays, Chapman and Hall/CRC, 2003、Simon et al. Design and Analysis of DNA Microarray Investigations, Springer, 2004、Real-Time PCR: Current Technology and Applications, Logan, Edwards, and Saunders eds., Caister Academic Press, 2009、Bustin A-Z of Quantitative PCR (IUL Biotechnology, No. 5), International University Line, 2004、Velculescu et al. (1995) Science 270: 484-487、Matsumura et al. (2005) Cell. Microbiol. 7: 11-18、Serial Analysis of Gene Expression (SAGE): Methods and Protocols (Method in Molecular Biology), Humana Press, 2008を参照されたい。

10

20

【0097】

一実施形態では、マイクロアレイを使用して、バイオマーカーのレベルを測定する。マイクロアレイ解析の利点は、バイオマーカーの各々の発現を同時に測定することができ、マイクロアレイは、特定の疾患又は状態、レギュロン又はネットワークの発現プロファイルを提供するように特異的に設計することができることである。

30

【0098】

マイクロアレイは、ポリヌクレオチド配列を含むプローブを選択し、次いでそのようなプローブを固体支持体又は表面に固定することによって調製される。例えば、プローブは、DNA配列、RNA配列、又はDNA及びRNAのコポリマー配列を含んでもよい。プローブのポリヌクレオチド配列はまた、DNA及び/若しくはRNA類似体、又はそれらの組み合わせを含んでもよい。例えば、プローブのポリヌクレオチド配列は、ゲノムDNAの完全又は部分的断片であってもよい。プローブのポリヌクレオチド配列はまた、合成オリゴヌクレオチド配列などの合成されたヌクレオチド配列であってもよい。プローブ配列は、インピボで、インピトロで酵素的に(例えば、PCRによって)、又はインピトロで非酵素的に合成することができる。

40

【0099】

本発明の方法で使用されるプローブは、好ましくは、多孔質又は非多孔質のいずれかであり得る固体支持体に固定される。例えば、プローブは、ニトロセルロース若しくはナイロン膜に結合されるか、又はポリヌクレオチドの3'若しくは5'末端のいずれかで共有結合でフィルタリングされるポリヌクレオチド配列であってもよい。そのようなハイブリダイゼーションプローブは、当該技術分野において周知である(例えば、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition, 2001)を参照されたい。あるいは、固体支持

50

体又は表面は、ガラス又はプラスチック表面であってもよい。一実施形態では、ハイブリダイゼーションレベルは、DNA若しくはDNA模倣物の集団、又は代替的にRNA若しくはRNA模倣物の集団などのポリヌクレオチドの集団が固定化された表面上の固相からなるプローブのマイクロアレイに対して測定される。固相は、非多孔質、又は任意選択で、ゲルなどの多孔質材料であってもよい。

【0100】

一実施形態では、マイクロアレイは、本明細書に記載されるバイオマーカーのうちの1つを各々表す、結合（例えば、ハイブリダイゼーション）部位又は「プローブ」の順序付けられたアレイを有する支持体又は表面を含む。好ましくは、マイクロアレイは、アドレス可能なアレイであり、より好ましくは、位置的にアドレス可能なアレイである。より具体的には、アレイの各プローブは、好ましくは、各プローブの同一性（すなわち、配列）がアレイ内のその位置（すなわち、支持体又は表面上）から決定され得るように、固体支持体上の既知の所定の位置に位置する。各プローブは、好ましくは、単一の部位で固体支持体に共有結合する。

10

【0101】

マイクロアレイは、いくつかの方法で作製することができ、そのうちのいくつかを以下に記載する。どのように生成されても、マイクロアレイは特定の特性を共有する。アレイは再現可能であり、所与のアレイの複数のコピーを生成し、互いに容易に比較することを可能にする。好ましくは、マイクロアレイは、結合（例えば、核酸ハイブリダイゼーション）条件下で安定である材料から作製される。マイクロアレイは、一般に、例えば、 $1\text{ cm}^2 \sim 25\text{ cm}^2$ の間の小さいが、例えば、スクリーニングアレイにおいて、より大きなアレイも使用されてもよい。好ましくは、マイクロアレイ内の所与の結合部位又は結合部位のユニークなセットは、細胞内の単一遺伝子の産物（例えば、特定のmRNA、又はそれに由来する特定のcDNA）に特異的に結合する（例えば、ハイブリダイズする）。

20

【0102】

しかしながら、一般に、他の関連又は類似の配列は、所与の結合部位にクロスハイブリダイゼーションする。

【0103】

上述したように、特定のポリヌクレオチド分子が特異的にハイブリダイズする「プローブ」は、相補的なポリヌクレオチド配列を含む。マイクロアレイのプローブは、典型的には、1,000ヌクレオチド以下のヌクレオチド配列からなる。いくつかの実施形態では、アレイのプローブは、10~1,000ヌクレオチドのヌクレオチド配列からなる。一実施形態では、プローブのヌクレオチド配列は、長さが10~200ヌクレオチドの範囲であり、1つの生物種のゲノム配列であり、その結果、複数の異なるプローブが存在し、配列は相補的であり、したがって、そのような生物種のゲノムにハイブリダイズすることができ、ゲノムの全て又は一部にわたって順次タイル表示される。他の実施形態では、プローブは、10~30ヌクレオチド長の範囲、10~40ヌクレオチド長の範囲、20~50ヌクレオチド長の範囲、40~80ヌクレオチド長の範囲、50~150ヌクレオチド長の範囲、80~120ヌクレオチド長の範囲、又は60ヌクレオチド長の範囲である。

30

40

【0104】

プローブは、生物のゲノム的一部分に対応するDNA又はDNA「模倣物」（例えば、誘導体及び類似体）を含み得る。別の実施形態では、マイクロアレイのプローブは、相補的RNA又はRNA模倣物である。DNA模倣物は、DNAとの特異的なワトソン-クリック様ハイブリダイゼーション、又はRNAとの特異的なハイブリダイゼーションが可能なサブユニットで構成されるポリマーである。核酸は、塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格（例えば、ホスホロチオエート）で修飾することができる。

【0105】

DNAは、例えば、ゲノムDNA又はクローン配列のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅によって得ることができる。PCRプライマーは、ゲノムDNAの特定の断片の増幅

50

をもたらすゲノムの既知の配列に基づいて選択されることが好ましい。当該技術分野で周知のコンピュータプログラムは、Oligoバージョン5.0 (National Biosciences) など、必要な特異性及び最適な増幅特性を有するプライマーの設計に有用である。典型的には、マイクロアレイ上の各プローブは、10塩基から50,000塩基の間、通常は300塩基から1,000塩基の長さである。PCR方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Innis et al., eds., PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications, Academic Press Inc., San Diego, Calif. (1990)に記載されている。制御されたロボットシステムが核酸の単離及び増幅に有用であることは、当業者には明らかであろう。

【0106】

ポリヌクレオチドプローブを生成するための代替的な好ましい手段は、合成ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの合成によって、例えば、N-ホスホネート又はリン酸アミダイト化学を使用することである (Froehler et al., Nucleic Acid Res. 14: 5399-5407 (1986)、McBride et al., Tetrahedron Lett. 24: 246-248 (1983))。合成配列は、典型的には約10~約500塩基の長さであり、より典型的には約20~約100塩基の長さであり、最も好ましくは約40~約70塩基の長さである。いくつかの実施形態では、合成核酸は、イノシンなどの非天然塩基を含むが、決してこれに限定されない。上述したように、核酸類似体は、ハイブリダイゼーションのための結合部位として使用されてもよい。好適な核酸類似体の例は、ペプチド核酸である (例えば、Egholm et al., Nature 363: 566-568 (1993)、米国特許第5,539,083号を参照されたい)。

【0107】

プローブは、好ましくは、結合エネルギー、塩基組成、配列の複雑さ、クロスハイブリダイゼーション結合エネルギー、及び二次構造を考慮に入れるアルゴリズムを使用して選択される。Friendらの国際特許公開第01/05935号(2001年1月25日公開)、Hughes et al., Nat. Biotech. 19: 342-7 (2001)を参照されたい。

【0108】

当業者であれば、陽性対照プローブ、例えば、標的ポリヌクレオチド分子中の配列に相補的かつハイブリダイゼーション可能であることが知られているプローブ、及び陰性対照プローブ、例えば、標的ポリヌクレオチド分子中の配列に相補的でなく、ハイブリダイゼーション可能であることが知られているプローブをアレイに含めるべきであることも理解するであろう。一実施形態では、陽性対照は、アレイの周囲に沿って合成される。別の実施形態では、陽性対照は、アレイに対して斜めの縞で合成される。また別の実施形態では、各プローブの逆相補鎖は、プローブの位置の隣に合成され、陰性対照として機能する。また別の実施形態では、他の生物種由来の配列を、陰性対照又は「スパイクイン(spike-in)」対照として使用する。

【0109】

プローブは、例えば、ガラス、プラスチック(例えば、ポリプロピレン、ナイロン)、ポリアクリルアミド、ニトロセルロース、ゲル、又は他の多孔質若しくは非多孔質材料から作製され得る固体支持体又は表面に結合される。核酸を表面に付着させるための1つの方法は、Schena et al., Science 270: 467-470 (1995)によって一般的に説明されているように、ガラスプレート上で印刷することによってである。この方法は、cDNAのマイクロアレイを調製するために特に有用である(それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、DeRisi et al., Nature Genetics 14: 457-460 (1996)、Shalon et al., Genome Res. 6: 639-645 (1996)、及びSchena et

al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93: 10539 - 11286 (1995) も参照されたい)。

【0110】

マイクロアレイを作製するための第2の方法は、高密度オリゴヌクレオチドアレイを生成する。技法は、その場で合成するためのフォトリソグラフィ技法を使用して、表面上の定義された位置で、定義された配列に相補的な何千ものオリゴヌクレオチドを含有するアレイを生成するために知られている(例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、Fodor et al., 1991, Science 251: 767 - 773、Pease et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91: 5022 - 5026、Lockhart et al., 1996, Nature Biotechnology 14: 1675、米国特許第5,578,832号、同第5,556,752号、及び同第5,510,270号を参照されたい)、又は定義されたオリゴヌクレオチドの迅速な合成及び沈着のための他の方法(その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Blanchard et al., Biosensors & Bioelectronics 11: 687 - 690を参照されたい)が知られている。これらの方法を使用する場合、既知の配列のオリゴヌクレオチド(例えば、60量体)は、誘導体化されたスライドガラスなどの表面上で直接合成される。通常、生成されるアレイは冗長であり、RNA当たりいくつかのオリゴヌクレオチド分子を有する。

10

【0111】

例えば、マスキングによって、マイクロアレイを作製するための他の方法(Masko and Southern, 1992, Nuc. Acids. Res. 20: 1679 - 1684(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる))も使用され得る。原則として、任意の種類のアレイ、例えば、ナイロンハイブリダイゼーション膜上のドットプロット(Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, 2001)を使用することができる。しかしながら、当業者によって認識されるように、ハイブリダイゼーション体積がより小さいため、非常に小さいアレイがしばしば好ましい。

20

【0112】

マイクロアレイはまた、例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,028,189号においてBlanchardによって、Blanchard et al., 1996, Biosensors and Bioelectronics 11: 687 - 690、Blanchard, 1998, Synthetic DNA Arrays in Genetic Engineering, Vol. 20, J. K. Setlow, Ed., Plenum Press, New Yorkの頁111 - 123において記載された方法及びシステムを使用する、オリゴヌクレオチド合成のためのインクジェット印刷デバイスを用いて製造することもできる。具体的には、そのようなマイクロアレイ中のオリゴヌクレオチドプローブは、例えば、スライドガラス上で、プロピレンカーボネートなどの高表面張力溶媒の「微小滴(microdroplet)」に個々のヌクレオチド塩基を連続的に堆積させることによって、アレイで合成される。微小滴は、小さな体積(例えば、100 pL以下、より好ましくは50 pL以下)を有し、マイクロアレイ上で互いに(例えば、疎水性ドメインによって)分離されて、アレイ要素(すなわち、異なるプローブ)の位置を画定する円形表面張力ウェルを形成する。このインクジェット方法によって製造されるマイクロアレイは、典型的には高密度であり、好ましくは、1 cm当たり少なくとも約2,500個の異なるプローブの密度を有する。ポリヌクレオチドプローブは、ポリヌクレオチドの3'又は5'末端のいずれかで支持体に共有結合している。マイクロアレイ解析によって測定され得るバイオマーカーポリヌクレオチドは、RNA又はそれに由来する核酸(例えば、RNAポリメラーゼプロモーターを組み込むcDNAに由来するcDNA又は増幅RNA)を発現させることができ、天然に存在する核酸分子、並びに合成核酸分子を含む。一実施形態では、標的ポリヌクレオチド

30

40

50

分子は、全細胞RNA、ポリ(A)⁺メッセンジャーRNA(mRNA)又はその画分、細胞質mRNA、又はcDNAから転写されるRNA(すなわち、cRNA;例えば、1999年10月4日に出願されたLinsley & Schelter、米国特許出願第09/411,074号、又は米国特許第5,545,522、同第5,891,636号、又は同第5,716,785号を参照されたい)を含むが、これらに限定されないRNAを含む。総RNA及びポリ(A)⁺RNAを調製するための方法は、当該技術分野において周知であり、例えば、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition, 2001)に一般的に記載されている。RNAは、Ausubel et al., eds., 1989, Current Protocols In Molecular Biology, Vol. 11, Green Publishing Associates, Inc., John Wiley & Sons, Inc., New Yorkのpp. 13.12.1 - 13.12.5)に記載されているように、グアニジニウムチオシアン酸溶解、続いてCsCl遠心分離(Chirgwin et al., 1979, Biochemistry 18:5294 - 5299)、シリカゲルベースのカラム(例えば、RNeasy(Qiagen, Valencia, Calif.)若しくはStrataPrep(Stratagene, La Jolla, Calif.))を使用して、又はフェノール及びクロロホルムを使用して、目的の細胞から抽出することができる。ポリ(A)⁺RNAは、例えば、オリゴ-dTセルロースによる選択によって、又は代替的に、全細胞RNAのオリゴ-dTプライミング逆転写によって選択することができる。RNAは、当該技術分野で既知の方法、例えば、ZnCl₂とのインキュベーションによって断片化して、RNAの断片を生成することができる。

10

20

【0113】

一実施形態では、総RNA、mRNA、又はそれに由来する核酸は、刺激されたサンプルから単離される。特定の細胞において低発現であるバイオマーカーポリヌクレオチドは、正規化技術を使用して濃縮され得る(Bonaldo et al., 1996, Genome Res. 6:791 - 806)。

【0114】

上述したように、バイオマーカーポリヌクレオチドは、1つ以上のヌクレオチドで検出可能に標識することができる。当該技術分野で知られている任意の方法を使用して、標的ポリヌクレオチドを標識してもよい。好ましくは、この標識は、RNAの長さに沿って均一に標識を組み込み、より好ましくは、標識は、高効率で行われる。例えば、ポリヌクレオチドは、オリゴ-dTプライミング逆転写によって標識することができる。ランダムプライマー(例えば、9量体)を逆転写に使用して、ポリヌクレオチドの全長にわたって標識されたヌクレオチドを均一に組み込むことができる。あるいは、ランダムプライマーは、ポリヌクレオチドを増幅するために、PCR方法又はT7プロモーターベースのインビトロ転写方法と併せて使用されてもよい。

30

【0115】

検出可能な標識は、発光標識であってもよい。例えば、蛍光標識、生物発光標識、化学発光標識、及び比色標識は、本発明の実施において使用され得る。使用可能な蛍光標識としては、フルオレセイン、蛍光体、ローダミン、又はポリメチン色素誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0116】

更に、FluorePrime(Amersham Pharmacia, Piscataway, N.J.)、FluoreDite(Millipore, Bedford, Mass.)、FAM(ABI, Foster City, Calif.)、及びCy3又はCy5(Amersham Pharmacia, Piscataway, N.J.)などの蛍光ホスホルアミダイトが挙げられるが、これらに限定されない市販の蛍光標識を使用してもよい。あるいは、検出可能な標識は、放射性標識されたヌクレオチドであり得る。

50

【0117】

一実施形態では、サンプルからのバイオマーカーポリヌクレオチド分子は、参照サンプルの対応するポリヌクレオチド分子とは異なる方法で標識される。参照は、正常な生体サンプル（すなわち、対照サンプル、例えば、s L R Iに感受性のない個体からの刺激されたC M B C）から、又は参照生体サンプル（例えば、s L R Iに感受性のある個体からの刺激されたC M B C）からのポリヌクレオチド分子を含むことができる。

【0118】

核酸ハイブリダイゼーション及び洗浄条件は、標的ポリヌクレオチド分子が、アレイの相補的ポリヌクレオチド配列、好ましくは、その相補的DNAが位置する特定のアレイ部位に特異的に結合するか、又は特異的にハイブリダイゼーションするように選択される。その上に位置する二本鎖プローブDNAを含むアレイは、好ましくは、標的ポリヌクレオチド分子と接触する前に、DNAを一本鎖にする変性条件に供する。一本鎖プローブDNA（例えば、合成オリゴデオキシリボ核酸）を含有するアレイは、標的ポリヌクレオチド分子と接触する前に、例えば、自己相補配列に起因して形成されるヘアピン又は二量体を除去するために、変性させる必要があり得る。

【0119】

最適なハイブリダイゼーション条件は、プローブ及び標的核酸の長さ（例えば、オリゴマー対200塩基を超えるポリヌクレオチド）及び種類（例えば、RNA又はDNA）に依存する。当業者は、オリゴヌクレオチドが短くなるにつれて、満足いくハイブリダイゼーション結果のために比較的均一な融解温度を達成するためにそれらの長さを調整する必要が生じ得ることを理解するであろう。核酸の特異的（すなわち、ストリンジェントな）ハイブリダイゼーション条件の一般的なパラメータは、Sambrook, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001) 及び Ausubelら、*Current Protocols In Molecular Biology, vol. 2, Current Protocols Publishing, New York* (1994) に記載されている。SchenarらのcDNAマイクロアレイの典型的なハイブリダイゼーション条件は、5xSSCに0.2% SDSを加えて65で4時間ハイブリダイゼーションし、続いて低ストリンジェンシー洗浄緩衝液（1xSSCに0.2% SDSを加える）で25で洗浄し、続いて高ストリンジェンシー洗浄緩衝液（0.1xSSCに0.2% SDSを加える）で25で10分洗浄することである（Schenar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:10614 (1993)）。有用なハイブリダイゼーション条件は、例えば、Tijessen, 1993, *Hybridization With Nucleic Acid Probes*, Elsevier Science Publishers B.V.、及びKricka, 1992, *Nonisotopic Dna Probe Techniques*, Academic Press, San Diego, Calif.にも提供されている。特に好ましいハイブリダイゼーション条件としては、1MのNaCl、50mMのMES緩衝液（pH 6.5）、0.5%のサルコシナトリウム及び30%のホルムアミド中で、プローブの平均融解温度又はそれに近い温度（例えば、51以内、より好ましくは21以内）でのハイブリダイゼーションが挙げられる。

【0120】

蛍光標識遺伝子産物を使用する場合、マイクロアレイの各部位における蛍光放出は、好ましくは、走査共焦点レーザー顕微鏡法によって検出され得る。一実施形態では、適切な励起線を使用して、使用される2つのフルオロフォアの各々について、別個のスキャンが実行される。あるいは、2つのフルオロフォアに特異的な波長で標本を同時に照射し、2つのフルオロフォアからの放出を同時に解析することを可能にするレーザーを使用してもよい（Shalon et al., 1996, "A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybrid

10

20

30

40

50

ization, " Genome Research 6 : 639 - 645 を参照されたく、これらは、あらゆる目的のためにその全体が参照により組み込まれる)。アレイは、コンピュータ制御の X - Y ステージ及び顕微鏡対物レンズを備えたレーザー蛍光スキャナーで走査され得る。2つのフルオロフォアの順次励起は、マルチラインの混合ガスレーザーで達成され、放出された光は波長によって分割され、2つの光電増倍管で検出される。蛍光レーザー走査デバイスは、S chena et al., Genome Res. 6 : 639 - 645 (1996)、及び本明細書で引用される他の参考文献に記載されている。あるいは、Ferguson et al., Nature Biotech. 14 : 1681 - 1684 (1996) によって記載される光ファイバー束は、多数の部位における mRNA 存在量レベルを同時にモニタリングするために使用され得る。

10

【0121】

ポリヌクレオチドは、ノーザンプロットティング、ヌクレアーゼ保護アッセイ、RNA フィンガープリンティング、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応、Q beta レプリカーゼ、等温増幅法、鎖置換増幅、転写ベースの増幅システム、ヌクレアーゼ保護 (S1ヌクレアーゼ又はRNAse保護アッセイ)、SAGE、並びに、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第88/10315号及び同第89/06700号、並びに国際出願第PCT/US87/00880号及び同第PCT/US89/01025号に開示される方法が挙げられるが、これらに限定されない、他の方法によって分析することもできる。

【0122】

20

標準的なノーザンプロットアッセイを使用して、当業者に既知の従来のノーザンハイブリダイゼーション技術に従って、RNA 転写物サイズを確認し、代替的にスプライスされたRNA 転写物、及びサンプル中の mRNA の相対量を特定することができる。ノーザンプロットでは、RNA サンプルは、変性条件下でアガロースゲル中で電気泳動によって最初にサイズによって分離される。次いで、RNA を膜に転写し、架橋し、標識されたプローブとハイブリダイゼーションさせる。ランダムプライミング、ニック翻訳、又はPCR生成DNAプローブ、インビトロ転写RNAプローブ、及びオリゴヌクレオチドを含む、非同位体又は高比放射能放射性標識プローブが使用され得る。加えて、部分的相同性のみを有する配列(例えば、異なる種由来のcDNA又はエクソンを含有し得るゲノムDNA断片)を、プローブとして使用してもよい。完全長の一本鎖DNA又はそのDNA配列の断片を含有する標識プローブ、例えば、放射性標識cDNAは、長さが少なくとも20、少なくとも30、少なくとも50、又は少なくとも100の連続したヌクレオチドであってもよい。プローブは、当業者に既知の多くの異なる方法のいずれかによって標識され得る。これらの研究で最も一般的に使用される標識は、放射性元素、酵素、紫外線に曝露したときに蛍光を発する化学物質などである。いくつかの蛍光材料が既知であり、標識として利用することができる。これらには、フルオレセイン、ローダミン、オーラミン、テキサスレッド、AMCAブルー、及びルシファーイエローが挙げられるが、これらに限定されない。特定の検出材料は、ヤギで調製され、イソチオシアネートを介してフルオレセインとコンジュゲートされた抗ウサギ抗体である。タンパク質は、放射性元素又は酵素で標識することもできる。放射性標識は、現在利用可能な計数手順のいずれかによって検出することができる。使用することができる同位体としては、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{35}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、及び ^{186}Re が挙げられるが、これらに限定されない。酵素標識も同様に有用であり、現在利用されている比色法、分光光度法、フルオロ分光光度法、電流測定法又はガス測定法のいずれかによって検出することができる。この酵素は、カルボジイミド、ジイソシアネート、グルタルアルデヒドなどの架橋分子との反応によって選択された粒子にコンジュゲートされる。当業者に既知の任意の酵素を利用することができる。このような酵素の例としては、ペルオキシダーゼ、ベータ-D-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ+ペルオキシダーゼ、及びアルカリホスファターゼが挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第3,654,090号、同第3,850,752号、及び同第4,

30

40

50

016, 043号は、代替標識材料及び方法の開示について例として参照される。

【0123】

ヌクレアーゼ保護アッセイ（リボヌクレアーゼ保護アッセイ及びS1ヌクレアーゼアッセイの両方を含む）は、特定のmRNAを検出及び定量化するために使用することができる。ヌクレアーゼ保護アッセイでは、（例えば、放射性標識された又は非同位体で標識された）アンチセンスプローブは、RNAサンプルへの溶液中でハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション後、一本鎖非ハイブリダイゼーションプローブ及びRNAは、ヌクレアーゼによって分解される。アクリルアミドゲルは、残りの保護された断片を分離するために使用される。典型的には、溶液ハイブリダイゼーションは、膜ベースのハイブリダイゼーションよりも効率的であり、最大20～30µgのプロットハイブリダイゼーションと比較して、最大100µgのサンプルRNAを収容することができる。ヌクレアーゼ保護アッセイの最も一般的なタイプであるリボヌクレアーゼ保護アッセイは、RNAプローブの使用を必要とする。オリゴヌクレオチド及び他の一本鎖DNAプローブは、S1ヌクレアーゼを含有するアッセイにのみ使用することができる。一本鎖アンチセンスプローブは、典型的には、ヌクレアーゼによるプローブ：標的ハイブリッドの切断を防止するために、標的RNAに対して完全に相同でなければならない。

10

【0124】

連続解析遺伝子発現（SAGE）を使用して、細胞サンプル中のRNA存在量を決定することもできる。例えば、それらの全体が参照により組み込まれる、Velculescu et al., 1995, Science 270:484-7、Carulli, et al., 1998, Journal of Cellular Biochemistry Supplements 30/31:286-96を参照されたい。SAGE解析は、検出のための特別なデバイスを必要とせず、多数の転写産物の発現を同時に検出するための好ましい解析方法のうちの一つである。まず、ポリA⁺RNAを細胞から抽出する。次に、RNAを、ビオチン化オリゴ（dT）プライマーを使用してcDNAに変換し、4塩基認識制限酵素（アンカー酵素：AE）は、3'末端にビオチン基を含有するAE処置断片をもたらす。次に、AE処置断片を、結合のためにストレプトアビジンと共にインキュベートする。結合したcDNAを2つの画分に分割し、次いで各画分を異なる二本鎖オリゴヌクレオチドアダプタ（リンカー）A又はBに連結する。これらのリンカーは、（1）アンカー酵素の作用によって形成される突出部分の配列に相補的な配列を有する突出一本鎖部分、（2）タグ付け酵素（TE）として機能するIIS型制限酵素の5'ヌクレオチド認識配列（認識部位から20bp以内の所定の位置で切断される）、及び（3）PCR特異的プライマーを構築するのに十分な長さの追加の配列から構成される。リンカー結合cDNAは、タグ付け酵素を使用して切断され、短鎖配列タグの形態で存在するリンカー結合cDNA配列部分のみが残る。次に、2つの異なるタイプのリンカーからの短鎖配列タグのプールが互いに連結され、続いて、リンカーA及びBに特異的なプライマーを使用したPCR増幅が行われる。結果として、増幅産物は、リンカーA及びBに結合した2つの隣接配列タグ（ジタグ（ditag））の無数の配列を含む混合物として得られる。増幅産物は、アンカー酵素で処理され、遊離ジタグ部分は、標準的な連結反応で鎖に連結される。次いで、増幅生成物をクローン化する。クローンのヌクレオチド配列の決定は、一定の長さの連続したジタグの読み出しを得るために使用することができる。次いで、各タグに対応するmRNAの存在は、クローンのヌクレオチド配列及び配列タグ上の情報から特定することができる。

20

30

40

【0125】

定量的逆転写酵素PCR（qRT-PCR）を使用して、バイオマーカーの発現プロファイルを決定することもできる（例えば、米国特許出願公開第2005/0048542A1号を参照されたい；その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。RT-PCRによる遺伝子発現プロファイリングの最初の工程は、RNAテンプレートのcDNAへの逆転写、続いてPCR反応におけるその指数関数的増幅である。最も一般的に使用される2つの逆転写酵素は、アピロ骨髄芽細胞症ウイルス逆転写酵素（AMV-RT）及びモロ

50

4 (1 9 9 6) を参照されたい。

【 0 1 3 0 】

RNAシーケンシング (RNA-seq) などの次世代シーケンシング方法を使用して、サンプル細胞中のRNA存在量を評価することもできる。RNA-seqを行う例示的なプロトコルとしては、RNA ACCESS (登録商標) プロトコル又はTRUSEQ (登録商標) RIBO-ZERO (登録商標) プロトコル (ILLUMINA (登録商標)) が挙げられる。当業者であれば、総RNAシーケンシング、mRNAシーケンシング、3' mRNAシーケンシング、5' mRNAシーケンシング、CAGE-Seqを含むがこれらに限定されない、RNA-seqを行う多くの方法も認識するであろう。

【 0 1 3 1 】

バイオマーカーデータは、患者がsLRIに感受性があるかどうかを評価するために、バイオマーカーを特定し、試験発現プロファイルと参照発現プロファイルとの間で観察されたバイオマーカーのレベルの差の統計的有意性を決定するために、様々な方法によって解析され得る。ある特定の実施形態では、患者データは、多変量線形判別解析 (LDA)、受信者動作特性 (ROC) 解析、主成分解析 (PCA)、アンサンブルデータマイニング方法、ベイズ一般化線形モデル、ガウスプロセス、ナイーブベイズ、弾性ネット、k近傍、ラッソ、ペナルティロジスティック回帰、部分最小二乗、マイクロアレイの予測解析 (PAM)、ポアソン線形判別解析、ネガティブ二項線形判別解析、ニューラルネットワーク、サポートベクターマシン、マイクロアレイの有意性解析 (SAM)、マイクロアレイの細胞特異的有意性解析 (csSAM)、密度正規化イベントのスパニングツリー進行解析 (SPADE)、及び多次元タンパク質識別技術 (MUDPIT) 解析が挙げられるが、がこれらに限定されない、1つ以上の方法によって解析される。(例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、Hilbe (2009) Logistic Regression Models, Chapman & Hall/CRC Press, McLachlan (2004) Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition, Wiley Interscience, Zweig et al. (1993) Clin. Chem. 39: 561-577, Pepe (2003) The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction, New York, NY: Oxford
Sing et al. (2005) Bioinformatics 21: 3940-3941, Tusher et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 5116-5121, Oza (2006) Ensemble data mining, NASA Ames Research Center, Moffett Field, CA, USA, English et al. (2009) J. Biomed. Inform. 42 (2): 287-295, Zhang (2007) Bioinformatics 8: 230, Shen-Orr et al. (2010) Journal of Immunology 184: 144-130, Qiu et al. (2011) Nat. Biotechnol. 29 (10): 886-891, Ru et al. (2006) J. Chromatogr. A. 1111 (2): 166-174, Jolliffe Principal Component Analysis (Springer Series in Statistics, 2nd edition, Springer, NY, 2002), Koren et al. (2004) IEEE Trans Vis Comput Graph 10: 459-470を参照されたい)。

【 0 1 3 2 】

バイオマーカーデータ、すなわち遺伝子発現データを解析する好ましい方法は、ランダムフォレスト分類器によってである。

【 0 1 3 3 】

ランダムフォレスト分類器

10

20

30

40

50

ランダムフォレスト分類器は、多くの決定木で構成され、個々の木によって出力されるクラスのモードであるクラスを出力するアンサンブル分類器である。ランダムフォレストは、相互検証の代わりにブートストラップを利用する。反復ごとに、(置換を伴う)ランダムサンプルが描画され、可能な限り最大の木が成長される。各木は、最終クラス予測で投票を受け取る。ランダムフォレストに適合するために、木の数(例えば、ブートストラップ反復)が指定される。ランダムフォレストアルゴリズムは、訓練精度の平均的な低下によってバイオマーカーの重要性を測定する。ランダムフォレスト法は、多数の異なる決定木を使用する。バイオマーカーは、有意なランダムフォレスト解析から決定木の意思決定分岐として機能した場合、識別的意義を有するとみなされる。

【0134】

10

ランダムフォレスト(単数又は複数)は、多くの決定木で構成され、個々の木によって出力されるクラスのモードであるクラスを出力するアンサンブル分類器である。(Breiman, Leo (2001). "Random Forests". *Machine Learning* 45(1): 5-32)。ランダムフォレストは、利用可能な最も正確な学習アルゴリズムのうちの一つであり、すなわち、データセットのための非常に正確な分類器を生成する。(Caruana, Rich; Karampatziakis, Nikos; Yessenalina, Ainur (2008) "An empirical evaluation of supervised learning in high dimensions." *Proceedings of the 25th International Conference on Machine Learning (ICML)*)。この方法は、制御されたバリエーションを有する決定木の集合を構築するために、「バギング」と特徴のランダムな選択とを組み合わせる。特徴のランダムなサブセットの選択は、確率的な識別を実装する方法であるランダムなサブ空間方法の例である。ブートストラップ分布は、元のデータに基づいて統計の変動を推定する方法として使用される。ブートストラップサンプル、例えば、150又は500で成長した各木について、ブートストラップサンプルの外に残された観測値のエラー率が監視される。これは「アウトオブバッグ」エラー率と呼ばれる。

20

【0135】

各木は、以下のアルゴリズムを使用して構築される:(1)訓練事例の数をNとし、分類器の変数の数をMとし、(2)木のノードでの決定を決定するために使用される入力変数の数mとし(mはMよりもはるかに小さいはずであり)、(3)利用可能な全てのNつの訓練事例(すなわち、ブートストラップサンプルを取る)から置換されたn回を選択することによって、この木の訓練セットを選択し、残りの事例を使用して、それらのクラスを予測することによって、木の誤差を推定し、(4)木の各ノードについて、そのノードで決定に基づいて決定を下すためのm個の変数をランダムに選択する。訓練セット内のこれらのm個の変数に基づいて最良の分割を計算し、(5)各木は完全に成長し、枝刈りされない(通常の木分類器を構築する際に行うことができる)。

30

【0136】

予測のために、新しいサンプルが木の下に押し出される。ターミナルノードに訓練サンプルのラベルが割り当てられる。この手順は、アンサンブル内の全ての木に対して反復され、全ての木のモード投票は、ランダムフォレスト予測として報告される。

40

【0137】

一実施形態では、ランダム入力を使用した木のフォレストに基づいた分類及び回帰を含むランダムフォレスト解析は、"randomForest: Breiman and Cutler's random forests for classification and regression" (Depends: R(>=2.5.0)、stats) (バージョン: 4.6-6) (2012-01-06)を使用して行う(Fortran original by Leo Breiman and Adele Cutler, Report by Andy Liaw and Matthew Wiener). A. Liaw and M. Wiener (2002). *Classification*

50

ion and Regression by randomForest. R News 2(3), 18-22を参照されたい。

【0138】

ランダムフォレストは、各々がその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Liauw and Wiener, R News Vol. 2/3, December 2002, pgs. 18-22、Dfaz-Urriarte and Alvarez, BMC Bioinformatics. 2006 Jan. 6; 7:3)、Statnikov et al., BMC Bioinformatics. 2008 Jul. 22; 9:319、Shi et al., Mod Pathol. 2005 April; 18(4): 547-57、Breiman, 1999, "Random Forests - Random Features," Technical Report 567, Statistics Department, U.C. Berkeley, September 1999 (その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に更に記載されている。

10

【0139】

呼吸器感染症

本発明は、呼吸器感染症に対する感受性を決定するための方法を提供する。好ましくは、呼吸器感染症は、下気道感染症である。任意の実施形態では、感染症は、細菌又はウイルス感染症であり得る。細菌感染症は、本明細書に記載されるいずれかであり得る。ウイルス感染症は、本明細書に記載されるいずれかであり得る。

【0140】

本明細書で使用される場合、呼吸器感染症という用語は、気道内の任意の場所でのウイルス又は細菌による感染症を意味する。呼吸器感染症の例としては、風邪、副鼻腔炎、喉の感染症、扁桃炎、喉頭炎、気管支炎、肺炎、又は細気管支炎が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、本発明の任意の実施形態では、呼吸器感染症は、風邪である。

20

【0141】

個体は、ウイルス検査によって気道感染症を有すると特定され得、かゆみ、水様目、鼻水、鼻づまり、くしゃみ、喉の痛み、咳、頭痛、発熱、倦怠感、疲労及び脱力感の症状を示すことがある。一態様では、呼吸器感染症を有する対象は、任意の他の呼吸器状態を有さなくてもよい。ウイルスの存在又は量の検出は、臨床サンプル(鼻腔洗浄、痰、BAL)又は血清学から単離されたRNAのPCR/シーケンシングによって行うことができる。

30

【0142】

インフルエンザ(一般に「インフルエンザ」と呼ばれる)は、鳥及び哺乳類に影響を与えるOrthomyxoviridae科のRNAウイルス(インフルエンザウイルス)によって引き起こされる感染症である。この疾患の最も一般的な症状は、悪寒、発熱、喉の痛み、筋肉痛、激しい頭痛、咳、脱力感/疲労感、及び全身の不快感である。

【0143】

インフルエンザウイルスは、Orthomyxoviridae科の5属のうち3属を構成する。インフルエンザA型及びB型ウイルスは、季節性流行中に共循環し、重度のインフルエンザ感染を引き起こす可能性がある。インフルエンザC型ウイルス感染症はあまり一般的ではないが、重症であり、地域的流行を引き起こす可能性がある。

40

【0144】

インフルエンザA型ウイルスは、これらのウイルスに対する抗体応答に基づいて、異なる血清型又はサブタイプに細分化することができる。インフルエンザAウイルスは、ウイルスの表面上の2つのタンパク質、すなわち、ヘマグルチニン(H)及びノイラミニダーゼ(N)に基づいて、サブタイプに分割される。18の異なるヘマグルチニンサブタイプ及び11の異なるノイラミニダーゼサブタイプがある。(それぞれ、H1~H18及びN1~N11。)ヒトにおいて確認されているサブタイプは、H1N1、H1N2、H2N2、H3N2、H5N1、H7N2、H7N3、H7N7、H9N2及びH10N7であ

50

る。

【0145】

インフルエンザは、公衆衛生に大きな影響を及ぼし、罹患率及び更には死亡率を含む壊滅的な健康問題に加えて、深刻な経済的影響を及ぼす。したがって、個体における感染を予防するか、又は感染の重症度を低減することができる治療薬が必要である。

【0146】

任意の実施形態では、予防が必要とされるインフルエンザ感染は、インフルエンザA型、B型又はC型からなる群から選択されるウイルスによる感染である。インフルエンザA型ウイルスは、これらのウイルスに対する抗体応答に基づいて、異なる血清型又はサブタイプに細分化され得る。インフルエンザAウイルスは、ウイルスの表面上の2つのタンパク質、すなわち、ヘマグルチニン(H)及びノイラミニダーゼ(N)に基づいて、サブタイプに分割される。18の異なるヘマグルチニンサブタイプ及び11の異なるノイラミニダーゼサブタイプ(それぞれ、H1~H18及びN1~N11)がある。ヒトにおいて確認されているサブタイプは、H1N1、H1N2、H2N2、H3N2、H5N1、H7N2、H7N3、H7N7、H9N2及びH10N7である。

10

【0147】

本発明の任意の態様では、この状態は、ライノウイルス又は呼吸器合胞体ウイルス(RSV)によって引き起こされ得る。更に、本発明の任意の態様では、ウイルス媒介性増悪は、ライノウイルス又はRSV媒介性である。ライノウイルス又はRSVは、本明細書に記載される任意の血清型であり得る。典型的には、ライノウイルスは、RV-A、RV-B、又はRV-Cライノウイルス種のメンバーである。

20

【0148】

本発明の別の態様では、状態は、ファミリー/属インフルエンザ、パラインフルエンザ、コロナウイルス、アデノウイルス、及びメタニューモンウイルスのウイルスを引き起こし得る。

【0149】

治療、投与、投薬量及び製剤

本発明は、人生の早い段階で、呼吸器感染症、例えば、重度の下気道感染症に感受性のある個体の特定を可能にする。これは、先制療法の形態での介入の機会を提供する。

【0150】

例示的な先制治療には、パリピズマブ、プレドニゾロン、オマリズマブ、又はポリバクテリア製剤、及びそれらの任意の組み合わせが挙げられる。

30

【0151】

「呼吸器」という用語は、酸素が体内に取り込まれ、二酸化炭素が鼻、喉、喉頭、気管、気管支及び肺を含む身体系を介して排出されるプロセスを指す。

【0152】

本明細書で使用される場合、上気道は、以下の領域を含み得る：鼻及び鼻通路、副鼻腔、咽頭、及び声帯(コード)の上の喉頭の部分。典型的には、下気道は、声帯の下の喉頭部分、気管、気管支及び細気管支を含む。肺は、下気道に含めることができ、呼吸器細気管支、肺胞管、肺胞嚢、及び肺胞を含む。

40

【0153】

「呼吸器疾患」又は「呼吸器状態」という用語は、炎症を伴い、上(鼻腔、咽頭及び喉頭を含む)及び下気道(気管、気管支及び肺を含む)を含む呼吸器系の成分に影響を及ぼすいくつかの疾患のうちのいずれか1つを指す。

【0154】

呼吸器疾患の症状には、咳、過剰な痰の産生、息切れの感覚、又は喘鳴が聞こえる胸の圧迫感が含まれる場合がある。運動能力は非常に限られている可能性がある。喘息では、体重、身長、及び年齢に基づいてノモグラフィ的に予測されたFEV_{1.0}(1秒間の強制呼気量)のパーセンテージは、強制呼気のピーク呼気流量と同様に減少し得る。COPDでは、FVCの比としてのFEV_{1.0}は、典型的には、0.7未満に低減される。

50

これらの各状態の影響は、仕事/学校を休んだ日数、睡眠障害、気管支拡張薬の必要性、経口グルココルチコイドを含むグルココルチコイドの必要性によっても測定され得る。

【0155】

呼吸器疾患の存在、改善、治療、又は予防は、対象の臨床的若しくは生化学的に関連する任意の方法、又はそれからの生検によって決定され得る。例えば、測定されるパラメータは、肺機能の存在又は程度、閉塞の徴候及び症状、運動耐性、夜間の覚醒、学校又は仕事で失われた日数、気管支拡張剤の使用、吸入コルチコステロイド（ICS）用量、経口（グルココルチコイド）GCの使用、他の薬の必要性、治療の必要性、入院であってもよい。

【0156】

対象の「治療」又は「治療すること」という用語は、疾患若しくは状態、疾患若しくは状態の症状、又は疾患若しくは状態のリスク（又は感受性）を遅らせる、遅延させる、安定化させる、硬化させる、治癒する、緩和する（alleviating）、緩和する（relieving）、変更する、修復する、悪化しない、改善する（ameliorating）、改善する（improving）、又は影響を与えることを目的とした、本明細書に記載の治療化合物の適用又は投与を含む。「治療すること」という用語は、軽減、寛解、悪化率の低下、疾患の重症度の低下、安定化、症状の軽減、又は傷害、病理学的状態を対象にとってより忍容性にすること、変性又は低下の速度を遅らせること、変性の最終点を衰弱させないこと、あるいは対象の身体的又は精神的幸福を改善することなど、任意の客観的又は主観的パラメータを含む、傷害、病理学的状態又は状態の治療又は改善における成功の任意の徴候を指す。

【0157】

療法に対する肯定的な反応は、呼吸器ウイルス感染後の呼吸器症状の悪化、例えば、喘息症状（増悪）の予防又は減弱であってもよい。これは、Juniper喘息コントロール質問票（Asthma Control Questionnaire）（ACQ-6）に基づいてベースラインから研究期間終了までの疾患スコアの平均変化を比較することによって評価することができ、また、風邪症状の感染/発症後、毎日下気道症状スコア（LRSS-胸痛、喘鳴、息切れ、及び咳の症状）を評価することもできる。ベースライン肺機能（ピーク呼気流量PEF）からの変化も評価することができ、療法に対する陽性応答は、PEFの低下における有意な減衰であり得る。例えば、プラセボ処置群は、増悪のピーク時に朝のPEFに15%の有意な低下を示す一方、処置群は、ベースラインからの15%未満の変化のPEFの有意な低下を示すであろう。

【0158】

本発明の方法による使用のための治療は、有効量で投与される。「治療有効量」又は「有効量」という語句は、(i)特定の疾患、状態、又は障害を治療する、(ii)特定の疾患、状態、又は障害の1つ以上の症状を緩和、改善、又は除去する、あるいは(iii)本明細書に記載の特定の疾患、状態、又は障害の1つ以上の症状の発症を遅延させる、本明細書に記載の治療を指す。好ましくない効果、例えば、副作用は、所望の治療効果と共に現れることがある。したがって、開業医は、適切な「有効量」であるかを決定する際に、潜在的な利点と潜在的なリスクとのバランスをとる。

【0159】

必要とされる正確な量は、対象の種、年齢及び全身状態、投与様式等に応じて、対象から対象まで変化する。したがって、正確な「有効量」を指定することは不可能な場合がある。しかしながら、任意の個々の場合における適切な「有効量」は、ルーチン実験のみを使用して当業者によって決定され得る。

【0160】

本明細書に記載される治療は、乾燥粉末、スプレー、ミスト、又はエアロゾルを含む鼻腔内投与のために製剤化され得る。これは、呼吸器感染症の治療のために特に好ましい場合がある。

【0161】

10

20

30

40

50

担体が液体である好適な製剤は、例えば、鼻腔スプレー又は鼻腔滴剤としての投与のために、活性成分の水性又は油性溶液を含む。あるいは、治療は、乾燥粉末として提供され、本明細書に定義されるようにのみ上気道に投与されてもよい。

【0162】

適切な担体の選択は、想定される特定の投与タイプに依存する。上気道、例えば、鼻粘膜表面を介した投与のために、本明細書に記載の治療の活性化合物は、点滴又はスプレーとしての鼻腔内投与のために、緩衝又は非緩衝の溶液、例えば、水又は等張生理食塩水、又は懸濁液として製剤化され得る。好ましくは、そのような溶液又は懸濁液は、鼻分泌液に対して等張であり、例えば、約 pH 4.0 ~ 約 pH 7.4、又は pH 6.0 ~ pH 7.0 の範囲の約同じ pH である。緩衝液は、生理学的に適合し、単に例として、リン酸緩衝液を含むべきである。例えば、代表的な鼻充血除去剤は、約 6.2 の pH に緩衝されるものとして記載される (Remington's, 同上, 1445 頁)。もちろん、当業者は、鼻及び/又は上気道投与のための無害な水性担体の好適な生理食塩水含有量及び pH を容易に決定することができる。

【0163】

当該技術分野で知られている防腐剤、着色剤、潤滑性又は粘性の鉱物油又は植物油、香料、芳香族油などの天然又は合成植物抽出物、並びに例えばグリセロールなどの湿潤剤及び粘度増強剤などの他の成分も含めることができ、製剤に追加の粘度、水分保持、並びに心地よいテクスチャー及び臭気を提供する。本明細書に記載される治療の経鼻投与のために、液滴 (drop)、液滴 (droplet)、及びスプレーを生成するための様々なデバイスが当該技術分野で利用可能である。例えば、本明細書に記載の治療は、一端に取り付けられた手動駆動ポンプ、例えば、可撓性ゴムバルブによって提供される空気圧によって、内容物が滴下されるガラス、プラスチック、又は金属分注チューブを含む単純な点滴器 (又はピペット) によって、鼻の通路に投与することができる。

【実施例】

【0164】

実施例 1 - 材料及び方法

研究集団

対象は、前述のように、喘息発症の高リスクのために出生前に登録された 10 年前向き出生コホートである小児喘息研究からの 50 人の個体のサブセットであった (Kusel et al., J Allergy Clin Immunol, 2007, 119: 1105 - 1110、Holt et al., J Allergy Clin Immunol, 2019, 143: 1176 - 1182 e1175、Kusel et al., Pediatr Infect Dis J, 2006, 25: 680 - 686、Kusel et al., Eur Respir J, 2012, 39: 876 - 882、Holt et al., J Allergy Clin Immunol, 2010, 125: 653 - 659、Kusel et al., J Allergy Clin Immunol, 2005, 116: 1067 - 1072)。胸のガラガラに加えて喘鳴及び/又は発熱が存在した場合、急性呼吸器感染症は sLRI とみなされた。ガラガラ (胸のガラガラ) は、子供の胸から聞こえる湿った騒々しい呼吸音と定義されたが、喘鳴は、可聴、呼気、高音の口笛音と定義された。発熱は、呼吸器感染症候群の発症から 48 時間後に 1 時間超離れて測定された 2 回の体温 > 38 (デジタル体温計) を記録することによって定義された。呼吸器ウイルス感染症の病歴は、詳細な評価及び症状発症から 48 時間以内の自宅訪問中に収集された鼻咽頭吸引物 (RT-PCR) から決定された (Kusel et al., J Allergy Clin Immunol, 2007, 119: 1105 - 1110、Kusel et al., Pediatr Infect Dis J, 2006, 25: 680 - 686)。5 歳現在での喘鳴 (Crwz5) は、5 年目のフォローアップの前の 12 ヶ月間に記録された任意の喘鳴事象 (親の評価) として定義された。5 歳での喘息は、これまでに喘息の医師診断、喘息薬への処方、及び 5 歳現在で喘鳴を有すると定義された。5 歳での非喘息決定は、これらの基準のいずれも有さ

なかった。出生時に臍帯血を採取し、末梢血を0.5、1、2、3、4、5、及び10歳で採取した（可能な限り生年月日の近くで）。

【0165】

免疫表現型決定

凍結保存したCBMCを解凍し、10%非熱不活性化FBS (Serana Australia) を含有するRPMI 1640 (Gibco) で洗浄した。10 μ lの細胞混合物をトリパンブルーで染色し、血球計で計数した。各サンプルについて、免疫表現型決定のために約1 \times 10⁶個の細胞を小分けし、非染色対照のために0.25 \times 10⁶個の細胞を小分けした。細胞を4で5分間、1500rpm (約500g) での遠心分離によってペレット化し、過剰な培地を真空吸引によって除去した。各サンプルを、50 μ lのモノクローナル抗体のマスターミックス (CD19 - FITC RRID: AB_395812、CD3 - AF700 RRID: AB_396952、CD4 - V500 RRID: AB_1937323、CD14 - APC - Cy7 RRID: AB_1645464、HLA - DR - PerCP - Cy5.5 カタログ番号347364、CD25 - BV421 RRID: AB_11154578、CD127 - BV605 RRID: AB_2738138、CD123 - CF594 RRID: AB_11153664、CD11c - PE - Cy7 RRID: AB_10611859 [BD Bioscience] 及びFcRI - APC RRID: AB_10671394 [eBioscience]) を、冷FACS緩衝液 (PBS + 1% BSA) 中で、暗所において4で30分間保存した。細胞を洗浄し、固定し、(Cytotfix / Cytoperm 緩衝液 (BD Biosciences)) で1時間透過させ、FoxP3 - PE (細胞内、BD Biosciences) で30分間インキュベートした。同じ抗体バッチを、製造業者が推奨する希釈で全てのサンプルに使用した。個々の細胞を、FACS Diva ソフトウェア (BD Biosciences) を用いたLSR - Fortessa プラットフォームを使用して、各サイトメトリ実行前の品質管理評価 (Rainbow 較正及びCS & T ビーズ (BD Biosciences)) の後に取得し、各サンプルについて未染色の対照を含めた。最初に、サンプルを補償し、FlowJo 10.3 ソフトウェアでゲーティングした。補償されたFCSファイルは、R (3.6.2) 統計環境にインポートされ、flowWorkspace 及びflowCore パッケージで前処理された。全てのサンプルにLogiclue 変換 (flowCore) 及びバッチ補正 (sva) を適用した。ノンパラメトリックな対応のある (ウィルコクソン記号順位検定) 又は対応のない (マン・ホイットニー-U 検定) 検定を使用して、群間の差異を決定した。

【0166】

インビトロ細胞培養

サンプルを無作為化ブロックに割り当て、一貫した試薬 / 刺激ストックを使用して同じ担当者によって順次培養した。臍帯血赤血球を免疫磁氣的に枯渇させ (Easy Sep キット、StemCell)、各サンプルを、RPMI + 5% AB 血清 (非加熱不活性化、Sigma - Aldrich) 中で、LPS (Enzo Biochem、1ng/ml)、イミキモド (Invivogen、5 μ l/ml) 及びPoly (I:C) (Invivogen、(50 μ l/ml)、マッチした刺激されていない対照と共に18時間 (37、5% CO₂) 培養した。サイトカイン定量のために、培養上清のアリコートを一20で保存した。細胞ペレットを、RNA 抽出のために -20でTrizol (Invitrogen) 中に保存した。

【0167】

データ生成

RNA - Seq: RNA を、RNeasy MinElute キット (Qiagen) を用いてバッチで抽出し、抽出バッチ情報を記録した。RNA 濃度を測定し (Bioanalyzer; Agilent, Santa Clara, USA)、良質であることが判明した (RIN スコア; 平均 = 8.514、95% CI = 8.46 ~ 8.567)。低収率プロトコルを、NEB Next Ultra II キット (New England

10

20

30

40

50

BioLabs, Massachusetts, USA) で調製し、シーケンシング (100bp ペアエンド) のためにオーストラリアゲノム研究施設 (AGRF, Melbourne, Australia) で NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, USA) プラットフォームで配列決定したシーケンシングライブラリーと共に用いた。

【0168】

サイトカイン: 48個のサイトカイン (Bio-plex Pro, BioRad) の濃度を、Luminex 200システム (Luminex) で同時に定量した。解析対象物定量 (pg/ml) は、標準曲線へのアライメントによって決定された。サイトカインパネルは、CTACK、塩基性FGF、エオタキシン、G-CSF、GM-CSF、GRO-、HGF、IFN-2、IFN-、IL-1、IL-1ra、IL-1、IL-2、IL-2R、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p40)、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17A、IL-18、IP-10、LIF、MCP-3、MCP-1、M-CSF、MIF、MIG、MIP-1、MIP-1、-NKG2A、PDGF-BB、SCF、SCGF-、SDF-1、RANTES、TNF、TRAIL、及びVEGFを含んだ。9つのサイトカインは、サンプルの>20%の検出限界外であり、除去された。

【0169】

データの前処理

RNAseq: バイナリベースコール (BCL) シーケンスファイルを、bc12fastqパイプライン (Illumina) を用いてfastqファイルに変換した。配列データを、Medical Sequence Analysis Pipeline (MESAP) で処理し、HISAT2を用いてhg38ゲノムにアライメントし (Pertea et al., Nat Protoc, 2016, 11:1650-1667)、カウントは、Genomic Alignments RパッケージからsummariseOverlaps機能を使用して定量化した。アライメント前及びアライメント後のQCは、それぞれ、FastQC及びSAMStatを用いて評価した。

【0170】

サイトカイン: サンプル (刺激されていないサンプルを除く) の30%を超える値が範囲外 (OOR) 値に記録された場合、サイトカインは除外された。これにより、CTACK、IL-3、IL-7、IL-8、IL-13、IL-18、PDGF-BB、SCGF、SDF-1が、更なる解析から除去された。残存するOOR値は、truncnorm Rパッケージからのtruncnorm関数を用いて、切れた正規分布に基づいて、最小値/最大値を下回る/上回るように補完させ、その結果、部分的な情報が、インピュテーションの検出限界を下回る/上回る値を定義するために使用される。変換及び正規化の最も適切な方法を試験し (データ図示せず)、ArcSinh変換及びLoess正規化を適用した。線形モデリング (limma RパッケージからのremoveBatchEffect関数) を用いて、バッチ効果を削除しました。

【0171】

次元削減: 実験設計は、同じバッチ内の各個体について、4つの条件 (刺激されていない、LPS-、イミキモド-、及びPoly (I:C) - 刺激された) からマッチしたデータが生成されることを確実にした。これにより、次元削減解析 (主成分解析) のためのマルチレベル設計が可能になり、それによって、被験者内分散が被験者間分散から分解され、その後の多変量解析の能力と解釈性が大幅に向上する。この目的のために、withinVariation関数は、RのmixOmicsパッケージから適応された (Rohart et al., PLoS Comput Biol, 2017, 13:e1005752)。

【0172】

転写物: 前処理の後、50人の個体について、マッチした刺激されていない、LPS-

、イミキモード -、及び Poly (I : C) - 刺激されたサンプルについての CBMC 遺伝子発現データを、RにおけるvarianceBasedfilter関数を用いて、有意に変動性の高い遺伝子だけにノイズを低減するようにフィルタ処理した。この解析では、遺伝子は、0.05 / 遺伝子数によって決定される、 2.88×10^{-6} の厳密な閾値よりも低いp値で有意であると考えられた ($n = 17356$)。これは、次元削減のための5,885個の遺伝子をもたらした。対象の変動内では、withinVariation関数を使用して計算し、遺伝子を単位変動にスケールリングし、FactoMineRパッケージからのPCA関数を主成分解析に使用し (Le et al., J of Statistical Software, 2008, 25: 1 - 18)、主成分得点と変動性寄与をプロットに使用した。

10

【0173】

サイトカイン：前処理の後、50人の個体について、マッチした刺激されていないサンプル、LPS -、イミキモード -、及び Poly (I : C) - 刺激されたサンプルについてのCBMCサイトカイン濃度データ ($n = 39$) から、対象内変動を (上記のように) 計算した。主成分解析を上記のように適用した。

【0174】

トランスクリプトーム解析

EdgeR：前処理後の解析には、合計50,019個の生の転写物が利用可能であった。生の転写物は、それらが任意のサンプル中にカウントを有さなかった場合、注釈を欠いた場合、又は25個のサンプル中で100万当たり0.5未満のカウントを有した場合に除去された。この戦略は、解析のために17,363個の転写物を生成した。データは、M値のトリム平均で正規化した (TMM正規化 (Robinson et al., Genome Biol, 2010, 11: R25))。実験設計は、(年齢及び刺激に関して) プロットのバッチへの無作為化を伴ったので、これらの対比較については、細胞培養バッチ番号に関連するバッチ効果はなかった。対応のない比較については、識別可能なバッチ効果は観察されなかったが、それでも培養バッチは、対応のない解析 (すなわち、乳児期におけるsLRI感受性) の共変量として含まれた。望ましくない変動を特定し、RUVSeq RパッケージからRUVg関数を使用して除去し (Risso et al., Nat Biotechnol, 2014, 32: 896 - 902)、これは、推定される技術的效果 (レーン、シーケンシングなど) を決定するために、一連の経験的対照遺伝子 (目的とする任意の比較との間で有意差はない) をモデル化する。RUVgによって共変量として特定された傾向を含む、マッチした刺激されたサンプルと刺激されていないサンプルとの間の解析のために対設計を用いた。EdgeR (Robinson et al., Bioinformatics, 2010, 26: 139 - 140) パイプラインを、estimateDisp、glmQLFit、glmLRT、及びtopTagsを含むデフォルトのパラメータで実行した。これは、各遺伝子のカウントに負の二項一般化対数線形モデルを適合させ、遺伝的尤度比検定を実施する。5歳 ($n = 27$) でのCBMCとマッチしたサンプルとの間の解析のために、マッチした刺激されていないサンプルと対応する刺激されたサンプルとの間の差異、並びにRUVg傾向をモデル化した対設計を採用した。非刺激 / 刺激及びRUVg傾向をモデル化した非ペア設計を使用して、主要アウトカム間の差を決定した。FDR制御 Benjamini - Hochberg法でのp値が0.01未満であり、Log 2倍の変化が1 (上方制御) 又は - 1 (下方制御) を上回る場合、遺伝子は有意差があるとみなされた。下流ネットワーク解析のために、修正された遺伝子数の行列を生成した。サイズ係数は、estimateSizeFactors関数を使用した中央値比率法を使用して推定し、DESeq2パッケージからのvarianceStabilizingTransformation関数を使用してカウントデータに分散安定化変換 (VST) を適用した (Love et al., Genome Biol, 2014, 15: 550)。技術的バリエーションと培養バッチに関連するRUVgトレンドは、limmaパッケージからremoveBatchEffect関数を有する線形モデルとの共変量として削除された。

20

30

40

50

【0175】

Limma - v o o m : 転写物フィルタ、正規化、及びモデル設計は、E d g e R解析で説明したのと同じように行った。データは、100万当たりlog₂カウントに変換され、平均分散関係は、v o o m関数を使用して重みを生成するように推定された。limma (Ritchie et al., Nucleic Acids Res, 2015, 43:e47) パイプラインを、lmFit、contrasts.fit、eBayes、及びtopTable関数を含むデフォルトパラメータを用いて実行した。遺伝子有意性を決定するために、E d g e R解析と同じ基準を適用した。この解析から、各遺伝子について計算された調整されたt統計量を、どのモジュールが刺激されたサンプルとマッチした刺激されていないサンプルとの間で差別的に調節されているかを表示する方法として、各ネットワークについてモジュールによってプロットした。調整されたt統計量は、その標準誤差に対するM値(対数₂倍の変化)の比率であり、これは、全ての遺伝子にわたって「調整された」(経験ベイズ)である。調整されたt統計量の代わりにモジュール固有遺伝子を適用すると、モジュールの上方/下方制御に関して同じ全体的な結果が得られた(データ図示せず)。中央値が2の調整されたt統計量を上回るモジュールは、有意に上方制御されたとみなされ、2未満のモジュールは、有意に下方制御されたとみなされる。

10

【0176】

重み付け遺伝子共発現ネットワーク解析: 修正されたカウントデータ(上述)を、解析のための17,363個の遺伝子を含む入力として使用した。この解析のために、3つのパーテーションネットワークを作成し、それらの各々は、刺激されていないサンプル及び対応する刺激されたサンプル(すなわち、LPS、イミキモド、及びPoly(I:C)ネットワーク)を含んだ(WGCNA (Zhang et al., Stat Appl Genet Mol Biol, 2005, 4: Article 17、Langfelder et al., BMC Bioinformatics, 2008, 9: 559))。varianceBasedfilter関数を使用して、各条件について有意に変異遺伝子(p値<0.01)、及び刺激されていないサンプルとそれぞれの刺激されたサンプルとの間の結合遺伝子をフィルタリングした。この戦略は、それぞれ、LPS、イミキモド、及びPoly(I:C)ネットワークに利用可能な6561個、6757個、及び6764個の遺伝子をもたらした。ソフト検出力は、networkTypeパラメータが「署名済み(signed)」に設定された状態のpickSoftThreshold関数で計算された。これにより、LPS、イミキモド、及びPoly(I:C)ネットワークに対してそれぞれ7、8、及び7のソフト検出力が得られた。隣接行列及びトポロジー重複行列(TOM)は、それぞれ、「署名済み」ネットワークを指定して、隣接及びTOMsimilarity関数を用いて作成された。TOM非類似性行列は、1-TOM類似性行列(1-TOM)によって計算した。モジュールは、hclust関数(方法=「平均」)を使用した階層クラスタリングによって特定され、cutreeDynamic関数(方法=「ハイブリッド」、deepSplit=2、minClusterSize=50)で同定された。TOMプロットは、TOMplot関数を使用して作成した。モジュール固有遺伝子は、モジュールEigengenes関数を用いて計算した。モジュールは、それらの固有遺伝子、階層的クラスタリング、及びmergeCloseModules関数を使用して0.1でカットされたデンドログラムの相関によって決定され、それらが類似している場合にマージされた。ネットワーク統計とモジュール内接続性は、intramodularConnectivity関数を使用して計算した。モジュールは、以下から有意に濃縮された(enriched)経路を評価することによって、コンセンサスアプローチでアノテーションされた: 遺伝子オントロジー用語エンリッチメント(GOenrichmentAnalysis)、ReactomePA (Yu et al., Mol Biosyst, 2016, 12: 477-479) 及びclusterProfiler (Yu et al., Omics, 2012, 16: 284-287) R packages, InnateDB (Breuer et

20

30

40

50

al., *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: D1228-1233)、及びトップモジュール遺伝子の特定 (\log_2 -FC/遺伝子接続性)。ネットワーク間のモジュール保存は、`modulePreservation`関数を使用して計算され、200の順列があり、`networkType`は「署名済み」に設定され、「gold」(ランダム)モジュールサイズは各比較の平均モジュールサイズに設定されている。ランク付けされた発現は、全てのサンプルにわたる各遺伝子の(ランク)平均発現として計算され、ランク付けされた接続性は、(ランク)`softConnectivity`関数を使用して計算され、タイプは「署名済み」に設定され、検出力は対応するネットワークのソフト検出力に設定された。ソフト接続性は、ネットワーク内の各遺伝子の他の全ての遺伝子に対する隣接性(共発現尺度)の合計として定義される。密度関数で接続性密度を決定し、`Sheather-Jones`平滑化帯域幅法を使用した。接続性密度は、正規性のリリーフォース(`Lilliefors`)検定(`lillie.test`関数)を用いて正規分布について評価した。また、各モジュールについてスピアマン相関マトリックスを計算して、他の全ての遺伝子に対する各遺伝子の相関値の合計として定義されるモジュール内接続性を個別に評価した。上位20個の最も接続された遺伝子のネットワーク配線図は、`igraph R`パッケージからの`graph_from_adjacency_matrix`関数を用いて構築した。ノードサイズは、ネットワーク全体の接続数(度)を表し、エッジは接続の強度を示す(赤いエッジは、相関 > 0.8 を示す)。

10

【0177】

マスターレギュレーター解析

20

遺伝子レギュレーターネットワークをARACNeでリバースエンジニアリングし(Margolin et al., *BMC Bioinformatics*, 2006, 7 Suppl 1, S7)、転写因子活性をVIPERで推測した(Alvarez et al., *Nat Genet*, 2016, 48: 838-847)。有意な($p < 0.05$)TFは、それらがRcisTargetによって決定されたレギュロン標的遺伝子の領域中に既知の結合モチーフを有する場合、応答のドライバーとみなされた(Aibar et al., *Nat Methods*, 2017, 14: 1083-1086)。VIPERから出力された正規化された発現スコア(NES)を、下流解析のために保持した。

【0178】

30

機械学習

遺伝子発現データを訓練(50%)及び検証(50%)セットにランダムに割り当て、各解析のそれぞれのモジュール遺伝子のみをフィルタリングした。全てのモデルに同じランダムな割り当てを適用した。検証モデルについては、CASコホートデータをそれぞれのモジュール遺伝子にフィルタリングし、訓練セットとして使用し、外部遺伝子発現データを検証に使用した(同一の入力遺伝子にフィルタリングした)。

【0179】

ランダムフォレストパッケージは、モデル構築のためにRで使用され、決定木(`ntree`)及び候補変数(`mtry`)の数は、アウトオブバッグエラーレートに従って最適化された。ランダムフォレスト(RF)解析は、WGCAによって定義されたモジュールを使用して実施され、WGCAは、共発現に従って遺伝子をクラスタリングすることにより、モジュールメンバーの遺伝子が高い多重共線性を示し、これはRF解釈に対する認識された影響である(Strobl et al., *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 307、Tolosi et al., *Bioinformatics*, 2011, 27: 1986-1994)。しかしながら、共線性は、主に可変的重要性の解釈に影響を及ぼし、全体的なモデル予測精度には影響を及ぼさない。このため、本研究で使用されるRF分類器は、主に、転帰を予測するためのIFNモジュール遺伝子の有用性を研究するために使用され、可変重要性尺度(図に報告されているが)は、それらの真の価値の過小評価とみなされるべきである。

40

【0180】

50

CASコホート：個体間のベースライン/刺激されていないCBMC遺伝子発現の潜在的な差異を説明するために、マッチした刺激された遺伝子発現プロファイル（例えば、LPS刺激された遺伝子発現 - マッチした刺激されていない遺伝子発現 = 調整されたLPS刺激された遺伝子発現マトリックス）から値を取り出し、これらを入力として使用した。対応する応答のIFNモジュールに存在するものみに遺伝子をフィルタリングした。対象（ $n = 50$ ）を試験セット又は検証セット（ $50 / 50$ 分割）のいずれかにランダムに割り当て、同じランダム割り当てをLPS、イミキモド及びPoly（I：C）データセットに適用した。randomForest関数（randomForest Rパッケージ）は、各分割時に候補としてランダムにサンプリングされた変数の数（「mtry」）及び成長する決定木の数（「ntree」）に関して、各RFモデルを最適化して、乳児期にSLRIを経験した個体と経験しなかった個体を分類した。mtryパラメータについては、10又は入力遺伝子の数の平方根のうちの低い方から入力遺伝子の数の平方根の最大5倍までの1ずつ増加する配列を定義した。ntreeを1000に設定して、シーケンス内の全ての数に対してRF分類器を構築し、最小のアウトオブバッグエラーレート（OOber）を記録したmtry値を最適として選択した。OOberが同数の場合、最小の数値が選択された。ntreeパラメータについて、100の増分で500から10,000までのシーケンスを定義し、mtryを上記に定義されるように最適に設定して、配列内の全ての数に対してRF分類器を構築した。最適なntreeは、最小のOOber（同数の場合は最小数）を生成するものを選択した。この手法により、LPS、イミキモド、及びPoly（I：C）RFモデルについて、それぞれ11、23、及び121のmtry、並びに5400、1000、及び1000のntree値が得られた。訓練セットを内部的にブートストラップした（ $70 / 30$ 分割）訓練済みモデルは、LPS、イミキモド、及びPoly（I：C）RFモデルでそれぞれ36%、72%、及び52%のOOberを報告した。最適化に続いて、最終的なRF分類器を使用して、予測関数（STATS Rパッケージ）を使用して、対応する検証セット（クラスラベルなし）の主要アウトカム状況を予測した。ROCR Rパッケージからの予測及びパフォーマンス関数を使用して、予測を真の値と比較し、計算する真陽性率及び偽陽性率並びに受信者動作特性（ROC）曲線下の面積を決定した。

10

20

30

40

50

【0181】

訓練/検証セットのリサンプリング：RF分類器の再現性を試験するために、調整されたLPS、イミキモド、及びPoly（I：C）データセットを、それらの訓練/検証セット割り当て（ $50 / 50$ 分割）に関して、それぞれ2000回無作為にリサンプリングした。同じ2000のランダム割り当てをLPS、イミキモド、及びPoly（I：C）分類器に使用した。RF分類器は、訓練セット上に構築され、各リサンプルについて（上記で事前に決定された最適パラメータを使用して）検証セット（上記のように）上で試験し、ROC曲線下の面積を、予測精度を決定するために毎回記録した。訓練及び検証セットの異なる比例割り当てが同様の結果をもたらしたかどうかを評価するために、調整されたLPS、イミキモド、及びPoly（I：C）データセットのRF分類器を、それぞれ、（訓練/検証セットの割り当てに関して）60% / 40%及び70% / 30%の訓練/検証割り当てで1000回無作為にリサンプリングした。LPS、イミキモド、及びPoly（I：C）分類器には、同じ1000のランダム割り当てを使用し、それらを上記の（視覚化された）パラメータで構築した。ROC曲線下の面積を各リサンプリングについて記録して、予測精度を決定した。

【0182】

外部コホートでの検証：本発明者らは、CBMCデータ上でRF分類器を訓練し、それらを使用して、Gene Expression Omnibusからの一連の公的に利用可能なデータセットに由来するサンプルを分類した。一般に、CASコホートからの刺激されていないサンプルを使用して「健康な」個体（感染症の不在）を表し、刺激されたサンプルを使用して、感染症が確認された乳児/小児の抗細菌（LPS）及び抗ウイルス（イミキモド/Poly（I：C））自然免疫応答を表した。GSE72809：RF分

類器を、調整されたLPS及びイミキモド/Poly(I:C)刺激されたCBMC遺伝子発現データセット(それぞれn=50)で訓練し、血液由来の遺伝子発現プロファイルからの健常な対照(n=52)からの細菌(n=52)及びウイルス(n=92)感染症で入院した小児をそれぞれ予測するために使用した。モデル最適化を実施し、モデル予測精度を、前述(上記)のように外部遺伝子発現プロファイルで試験した。GSE113211:RF分類器を、調整されたイミキモド及びPoly(I:C)刺激されたCBMC遺伝子発現データセット(それぞれn=50)で訓練し、PBMCSAMPLEから回復後(無症状、8.8±2.5週間後)に採取されたマッチしたサンプルから、急性ウイルス性細気管支炎で入院した乳児(18ヶ月、n=15)及び幼児(18ヶ月~5歳、n=16)を予測するために使用した。モデルの最適化を適用し、モデルの予測精度を、前述(上記)のように、全ての対象、並びに乳児及び小児について、外部遺伝子発現プロファイルで試験した。GSE115770:RF分類器を、調整されたイミキモド及びPoly(I:C)刺激されたCBMC遺伝子発現データセット(それぞれn=50)で訓練し、ウイルス関連(n=193)「風邪」様疾患を有する喘息の小児(6~17歳)を、非ウイルス「風邪」様疾患を有する喘息の小児(n=105)(発症後1~6日に採取されたサンプル)からの研究訪問を予測するために使用し、そのうちのいくつかは、後に増悪を経験した(58人は経験し、25人は経験しなかった)。モデル最適化を実施し、モデル予測精度を、前述(上記)のように、風邪症状を与えられたウイルス感染について、及び増悪を与えられたウイルス感染について、鼻及び血液由来遺伝子発現プロファイルについて別々に試験した。

10

20

【0183】

マルチオミクスデータ統合

DIABLO(Singh et al., Bioinformatics, 2019, 35:3055-3062)モデルを教師ありマルチオミクスデータ統合のために構築し、これは、部分最小二乗解析を一般化して、マッチしたデータセット間の共発現を最大化する。解析前に、全てのデータセット(免疫表現型決定を除く)をベースライン調整し、遺伝子発現データを有意に変動性遺伝子(n=6353)にフィルタリングして、ノイズを低減した。成分の数及び特徴選択パラメータは、5回の交差検証で調整した。

【0184】

統計解析

全ての統計解析は、R環境(バージョン3.6.2)で計算し、グラフは、R又はPrismソフトウェア(バージョン8、GraphPad Software, La Jolla California USA)から生成した。非パラメトリック統計学的方法を、群差(Mann-Whitney U検定(非対称解析)及びWilcoxon符号付きランク検定(対称解析); wilcox.test関数[stats Rパッケージ])及び相関(スピアマンの順位相関係数; cor.test関数[stats Rパッケージ])を試験するために適用した。研究集団特性の比較のために、フィッシャーの正確検定(fisher.test関数[stats Rパッケージ])を使用して、オッズ比、95%信頼区間、及びカテゴリー変数の付随するP値を計算し、Mann-Whitney U検定を使用して、連続変数のp値を決定した。

30

40

【0185】

実施例2 - 研究集団の臨床的特徴

研究集団は、小児喘息研究(CAS)コホート内の50人の小児のサブセットから構成された。23人の対象(46%)が、1年目(乳児期)に少なくとも1つの喘鳴及び/又は発熱性SLRIを経験し、これが対象の主要アウトカムであった(表1)。5歳現在の喘鳴(OR=2.48)及び喘息(OR=2.86)の有病率は、感受性のある個体の方が高かったが、これは統計的に有意ではなかった。性別、妊娠週数、出生体重、皮膚プリック試験陽性率、及び乳児期における主要アウトカムのURIに関して差は認められなかった。全体的に、このサブセットは、主要な臨床的特徴に関してCASコホート(n=263)を表すことがわかった(表1)。ライノウイルスは、このサブセット(感染性上咽

50

頭サンプルの56.9%に存在する)において生後1年目から特定された最も頻度の高いウイルス性因子であり、続いてRSV(13.125%) (データ図示せず)であった。

【0186】

【表1】

	CASサブセット (n=50)	sLRV1陽性 (n=27)	sLRV1陽性 (n=23)	OR (95% CI)	p値	CASサブセット (n=263)	OR (95% CI)	p値
性別 (女性)	24/50 (48%)	14/27 (51.85%)	10/23 (43.48%)	0.72 (0.2-2.51)	0.58	115/251 (45.82%)	0.92 (0.48-1.77)	0.88
妊娠 (週、平均 [範囲])	39.14 [36-41]	39.11 [36-41]	39.17 [37-41]	該当なし	0.96	39.03 [34-41]	該当なし	0.89
出生体重 (グラム、平均 [範囲])	3496.52 [2755-4415]	3468.56 [2755-4270]	3529.35 [2920-4415]	該当なし	0.65	3406.17 [2085-5110]	該当なし	0.27
0, 5年, 2年, 又は5年のSPT+	24/50 (48%)	16/27 (59.26%)	14/23 (60.87%)	1.07 (0.3-3.88)	1	118/198 (59.6%)	1.59 (0.82-3.13)	0.15
1年目のURI	47/50 (94%)	26/27 (96.3%)	21/23 (91.3%)	0.41 (0.01-8.41)	0.59	215/235 (91.49%)	0.69 (0.13-2.46)	0.78
1年目のLRV	39/50 (78%)	16/27 (59.26%)	23/23 (100%)	Inf (2.97-Inf)	0.0004	160/235 (68.08%)	0.6 (0.26-1.28)	0.18
1年目のsLRV1	23/50 (46%)	0/27 (0%)	23/23 (100%)	Inf (77.85-Inf)	>0.0001	101/235 (42.98%)	0.88 (0.46-1.72)	0.75
5歳現在の喘鳴	14/43 (32.56%)	6/25 (24%)	8/18 (44.44%)	2.48 (0.57-11.49)	0.2	56/198 (28.28%)	0.82 (0.38-1.8)	0.58
5歳での喘息	9/43 (20.93%)	3/19 (15.79%)	5/14 (35.71%)	2.86 (0.44-22.97)	0.24	37/198 (18.69%)	0.87 (0.37-2.24)	0.83
喘鳴症状なし (3~5歳)	15/44 (34.09%)	17/24 (70.83%)	12/18 (66.67%)	0.83 (0.18-3.82)	1	70/198 (35.35%)	1.06 (0.51-2.72)	1

略語: CAS=小児喘息研究, OR=オッズ比, CI=信頼区間, URI=上気道感染症 (ウイルス), LRV=下気道感染症 (ウイルス)。sLRV1は、主要アウトカム (生後1年におけるsLRV1の発生率) を表す。分類変数については、オッズ比、95%CI、及び付随するP値をフィジシャリーの正確率検定によって決定した。連続変数については、P値をマン・ホイットニーU検定によって決定した。太字で表されるP値は、統計的に有意であるとみなされる。

表1. 研究集団の特徴及び表現

【0187】

実施例3 - ベースラインフローサイトメトリー

11色のフローサイトメトリーパネルをベースライン臍帯血単核細胞(CBMC)サンプルに適用して、細胞組成を評価した。リンパ球(T細胞及びB細胞)は、CBMCの間で特定された細胞型の大部分を構成した(図1B)。骨髓コンパートメントの間でCD14+単球及び従来の樹状細胞(cDC)を特定し、形質細胞様DC(pDC)及び好塩基

10

20

30

40

50

球のより小さい割合も特定した(図1B)。生後1年目におけるsLRIに関してベースライン細胞組成に差はなかった(データ図示せず)。

【0188】

実施例4 - CBMCにおける先天性免疫応答のマルチオミクスプロファイリング

全50名の対象からのCBMCを、LPS(TLR4)、又はイミキモド(TLR7)、又はPoly(I:C)(TLR3)で18時間培養して、刺激されていない対照と共に自然免疫応答を誘発した(図1A)。この時点を選択して、即時及び二次応答プログラムの下流のシグナル伝達カスケードを捕捉した(Shalek et al., Nature, 2014, 510:363-369、Jovanovic et al., Science, 2015, 347:1259038、Lawlor et al., Front Immunol, 2021, 12:636720)。細胞ペレット(RNAseq)から遺伝子発現をプロファイリングし、上清を使用してサイトカインをプロファイリングした(マルチプレックスアッセイ)。5歳で収集したマッチするPBMCサンプルは、対象のサブセット(n=27)で利用可能であり、これらを同じ条件下で並行して培養した。データの前処理及びフィルタリングの後、17,363個の転写物及び39個のサイトカインが解析に利用可能であった(方法については実施例1を参照されたい)。探索的データ解析には、教師なし主成分解析(PCA)の次元削減を適用した。予想通りに、各オミクス層からのサンプルが刺激によってクラスター化した(図1C)。転写物及びサイトカインについて、最初の2つの主成分は、インターフェロン(IFN)及び炎症促進性特徴(例えば、CXCL10/IP-10、IL-1、IL-6)を捕捉した(図1D)。

10

20

【0189】

実施例5 - IFN及び炎症促進性遺伝子発現プログラムは、CBMC応答において上方制御される

最初の解析は、これらのデータがゲノム全体のカバレッジを提供するため、トランスクリプトミクスデータに焦点を当てた。差別的発現解析を用いて、641個の異なる発現遺伝子(DEG)が、臍帯血LPS応答(Log2倍変化>1、調整P値<0.01)について特定され、イミキモド応答及びPoly(I:C)応答(図2A~C、左パネル)について1000DEGを超えた。パスウェイ解析(InnateDB; Breuer et al., Nucleic Acids Res, 2013, 41:D1228-1233)は、全ての応答において上方制御された遺伝子からのサイトカイン及びケモカインシグナル伝達経路の濃縮を特定し、IFNシグナル伝達経路は、イミキモド及びPoly(I:C)CBMC応答において顕著であった(図2A~C;右パネル)。特に、ウイルス刺激は429個の上方制御遺伝子の共通セットを引き起こし、これはTLR3とTLR7活性化との間で共有されるコア抗ウイルス応答を構成した(データ図示せず)。加えて、それぞれPoly(I:C)又はイミキモドに反応して特異的に上方制御された462及び243個の遺伝子が特定され、TLR3又はTLR7活性化の下流の独自のシグナル伝達経路を示した(データ図示せず)。次にCIBERSORTxを使用して、RNA-Seqデータから培養後の細胞組成を推定した(Newman et al., Nat Biotechnol, 2019, 37:773-782)。顕著な細胞型としては、単球、B細胞、及びCD4+T細胞が挙げられる(データ図示せず)。赤血球の割合は、免疫磁気枯渇の結果として無視できるものであった(方法については実施例1を参照されたい)。細胞組成の変化は、刺激と年齢との間で特定されたが、乳児期における配列順序、性別、又はsLRIとの遭遇は特定されなかった。先天性免疫遺伝子発現の変動についての更なる調査も、出生時対5歳(年齢/刺激当たりn=27)で収集されたマッチするサンプルにおいて実施した(データ図示せず)。興味深いことに、5歳でのLPS応答は、出生時と比較して、IRF1、STAT1、及びIFIT1-3を含むIFN関連遺伝子の上方制御を特徴とした(表2)。対照的に、IFN関連遺伝子の差別的発現は、イミキモド又はPoly(I:C)刺激後の出生時と5歳時との間に観察されなかった(データ図示せず)。最後に、sLRIリスクが個々の遺伝子発現大きさのみによって付与されな

30

40

50

いことを示唆している（図示せず）この解析からの任意の状態について、s L R Iに耐性及び感受性のある乳児期の個体間に有意差のある遺伝子はなかった。

【 0 1 9 0 】

【表 2】

表 2. 出生時及びL P S刺激後 5 歳時での I F N関連遺伝子の差別的発現。

記号	logFC	FDR
IFNG	-1.841	3.45E-28
IFIT3	-1.779	3.29E-166
TLR3	-1.644	1.93E-16
IFIT1	-1.566	1.78E-75
OASL	-1.482	7.88E-58
IFIT2	-1.232	4.03E-82
MX1	-1.097	3.56E-107
OAS1	-1.097	8.10E-79
STAT1	-1.045	1.48E-89
IRF1	-1.044	3.05E-97

10

20

【 0 1 9 1 】

実施例 6 - 先天性免疫機能の基礎となる共発現ネットワークの特定

遺伝子は孤立して機能するのではなく、ネットワークで一緒に働く。遺伝子発現の全般的な結合構造及び機能的組織を解明するために、重み付き遺伝子共発現ネットワーク解析（WGCNA）を用いた。この解析は、それぞれ、L P S、イミキモド、及びP o l y（I：C）応答のための11、11、及び8の共発現モジュールを特定した（図2D～F）。全ての応答は、I F N及び炎症促進性モジュールの上方制御を示し、臍帯血の先天性応答の不可欠な構成要素が既に特定されていたため、それらは、下流解析のために繰り越された（図2D～F、図6A）。L P S応答は、イミキモド（1114個の遺伝子）及びP o l y（I：C）（2201個の遺伝子）と比較して最小のI F Nモジュール（180個の遺伝子；表3）を有し、逆は、炎症促進性モジュール（L P S、2297個の遺伝子；イミキモド、924個の遺伝子；P o l y（I：C）、646個の遺伝子）に当てはまった（図2G）。特に、I F Nと異なる刺激の炎症促進性モジュール遺伝子との間に、特にP o l y（I：C）I F NとL P S炎症促進性モジュール（n = 385個の遺伝子）との間に実質的な重複があった（データ図示せず）。

30

40

【 0 1 9 2 】

50

【表 3 - 1】

表 3. L P S 誘導インターフェロンモジュール遺伝子。遺伝子記号及び E N S E M B L 受託番号を提供する。

IDO1 ENSG00000131203	SOCS1 ENSG00000185338	GBP4 ENSG00000162654	CD80 ENSG00000121594	GBP1 ENSG00000117228	CXCL11 ENSG00000169248
CXCL9 ENSG00000138755	MT2A ENSG00000125148	TCAF2 ENSG00000170379	STAT1 ENSG00000115415	RTP4 ENSG00000136514	GBP5 ENSG00000154451
FBXO6 ENSG00000116663	HAPLN3 ENSG00000140511	CCL19 ENSG00000172724	APOL1 ENSG00000100342	PMAIP1 ENSG00000141682	USP30-AS1 ENSG00000256262
IL15RA ENSG00000134470	GBP2 ENSG00000162645	PARP9 ENSG00000138496	IRF1 ENSG00000125347	TCAF2C ENSG00000283528	TNFSF10 ENSG00000121858
APOL3 ENSG00000128284	TCAF2P1 ENSG00000159860	EPSTI1 ENSG00000133106	UBE2L6 ENSG00000156587	ETV7 ENSG00000010030	TTC39A ENSG00000085831
CETP ENSG00000087237	XAF1 ENSG00000132530	CMPK2 ENSG00000134326	GBP1P1 ENSG00000225492	HAS2 ENSG00000170961	APOL2 ENSG00000128335
IFI44 ENSG00000137965	WARS1 ENSG00000140105	RSAD2 ENSG00000134321	OR2IIP ENSG00000237988	LGALS3BP ENSG00000108679	IFNG ENSG00000111537
NLRC5 ENSG00000140853	OAS3 ENSG00000111331	APOL6 ENSG00000221963	PSME2 ENSG00000100911	PTGES3P1 ENSG00000234518	DLL4 ENSG00000128917
TRIM69 ENSG00000185880	ALPK1 ENSG00000073331	PSMB9 ENSG00000240065	NFE2L3 ENSG00000050344	FAS ENSG00000026103	PLAAT4 ENSG00000133321
HELZ2 ENSG00000130589	BCL2L14 ENSG00000121380	IFI35 ENSG00000068079	TRIM21 ENSG00000132109	UBD ENSG00000213886	IRF9 ENSG00000213928
TNFSF4 ENSG00000117586	RGS1 ENSG00000090104	SSTR2 ENSG00000180616	SMTNL1 ENSG00000214872	TIFA ENSG00000145365	TMEM229B ENSG00000198133
PSME1 ENSG00000092010	DDX60 ENSG00000137628	CASZ1 ENSG00000130940	HERC6 ENSG00000138642	CASP17P ENSG00000235505	SAMD9L ENSG000000177409
USP18 ENSG00000184979	NFIX ENSG00000008441	PSMB10 ENSG00000205220	GBP6 ENSG00000183347	DTX3L ENSG00000163840	PTPRK ENSG00000152894
IFIT3 ENSG00000119917	KLHDC7B ENSG00000130487	TAPBP ENSG00000231925	PARP12 ENSG00000059378	TAP2 ENSG00000204267	RCN1 ENSG00000049449
GPR174 ENSG00000147138	TAP1 ENSG00000168394	PARP10 ENSG00000178685	GBP3 ENSG00000117226	HLA-F ENSG00000204642	IFIH1 ENSG00000115267
GPR155 ENSG00000163328	PARP11 ENSG00000111224	LINC02328 ENSG00000258733	ERVK-28 ENSG00000267696	MX1 ENSG00000157601	TRIM22 ENSG00000132274

10

20

30

【 0 1 9 3 】

40

50

【表 3 - 2】

IL12RB1 ENSG000000 96996	TRAFD1 ENSG0000013 5148	IRF1-AS1 ENSG0000019 7536	OASL ENSG0000013 5114	ACOT7 ENSG0000009 7021	GCH1 ENSG0000013 1979
PARP3 ENSG0000004 1880	OPTN ENSG0000012 3240	MOV10 ENSG0000015 5363	ISG15 ENSG0000018 7608	MDGA1 ENSG0000011 2139	SAMD4A ENSG0000002 0577
SP110 ENSG0000013 5899	IL15 ENSG0000016 4136	CEACAM1 ENSG0000007 9385	CASP4 ENSG0000019 6954	PCGF5 ENSG0000018 0628	NMI ENSG0000012 3609
SYNPO2 ENSG0000017 2403	IFIT5 ENSG0000015 2778	CXCL10 ENSG0000016 9245	C4BPB ENSG0000012 3843	TRANK1 ENSG0000016 8016	GSDMD ENSG0000010 4518
CD69 ENSG0000011 0848	IFI6 ENSG0000012 6709	DHX58 ENSG0000010 8771	RABIAP1 ENSG0000022 9023	OAS2 ENSG0000011 1335	UBA7 ENSG0000018 2179
BISPR ENSG0000028 2851	PSMB8 ENSG0000020 4264	APOBEC3F ENSG0000012 8394	PLAT ENSG0000010 4368	DDX58 ENSG0000010 7201	HERC5 ENSG0000013 8646
E2F3P1 ENSG0000026 7046	DLG3 ENSG0000008 2458	PARP14 ENSG0000017 3193	CARD16 ENSG0000020 4397	CALHM6 ENSG0000018 8820	APOBEC3G ENSG0000023 9713
TOMM20P2 ENSG0000025 5987	LAG3 ENSG0000008 9692	HLA-A ENSG0000020 6503	TAF2 ENSG0000019 8673	IFI27 ENSG0000016 5949	MX2 ENSG0000018 3486
BTN3A1 ENSG0000002 6950	IFIT1 ENSG0000018 5745	USP41 ENSG0000016 1133	RHEBL1 ENSG0000016 7550	BTN3A3 ENSG0000011 1801	TMEM140 ENSG0000014 6859
RNF213 ENSG0000017 3821	CCL8 ENSG0000010 8700	ISG20 ENSG0000017 2183	BST2 ENSG0000013 0303	IFITM3 ENSG0000014 2089	LINC01949 ENSG0000023 3828
CLEC2B ENSG0000011 0852	LAP3 ENSG0000000 2549	LY6E ENSG0000016 0932	CCDC194 ENSG0000026 9720	BATF2 ENSG0000016 8062	EIF2AK2 ENSG0000005 5332
TNFSF13B ENSG0000010 2524	LINC02528 ENSG0000022 6004	DGLUCY ENSG0000013 3943	VAMP5 ENSG0000016 8899	NUB1 ENSG0000001 3374	SAMD9 ENSG0000020 5413
STAT2 ENSG0000017 0581	RNF213-AS1 ENSG0000026 3069	ZDHH4P1 ENSG0000023 8025	PGAP1 ENSG0000019 7121	IFIT2 ENSG0000011 9922	OAS1 ENSG0000000 89127
CD38 ENSG0000000 4468	XRN1 ENSG0000011 4127	GVINP1 ENSG0000025 4838	NT5C3A ENSG0000012 2643	LRRN2 ENSG0000017 0382	FBXO39 ENSG0000017 7294

10

20

30

【 0 1 9 4 】

次に、それぞれの応答間の遺伝子ネットワークパターンを比較した。第一に、モジュール保存統計を計算し、その結果、LPS誘導IFNモジュールがイミキモド及びPoly(I:C)応答のIFNモジュール内で高度に保存されたが、その逆ではなかったことを示した(データ図示せず)。イミキモド応答及びPoly(I:C)応答に関連するIFNモジュールを互いに内に保存し、炎症促進性モジュールを全ての応答の間に保存した(データ図示せず)。第二に、ランク付けされた遺伝子発現及びランク付けされた連結性を計算して、モジュールを比較した。発現大きさ($\rho = 0.88$ 及び 0.82)と、臍帯血LPS誘導IFNモジュール遺伝子と、それぞれイミキモド及びPoly(I:C)刺激後の同じ遺伝子との間のモジュール内接続性($\rho = 0.57$ 及び 0.59)との間に顕著な差異が観察された(図2H)。モジュール内の接続性を調べるために、各モジュール内の全ての遺伝子にわたる接続性密度をプロットし、最も接続された遺伝子を特定した(図3A、図3B~D、左パネル)。LPS誘導IFNモジュールの接続性は、正規分布によって特徴付けられたが、ウイルス刺激は左歪曲分布を生じた(図3A)。キーIFNシグナル遺伝子(例えば、IRF1、STAT1)は、LPS誘導IFNモジュール内で最も接続された遺伝子の間に存在したが、最も接続された遺伝子の強度は、ウイルス刺激のIFNモジュールと比較して低下した(図3B~D;左パネル)。LPS誘導性炎症促進性モジュールは、イミキモド又はPoly(I:C)誘導性炎症促進性モジュール

40

50

と比較して、より大きな接続性を示した（データ図示せず）。先天性免疫/炎症促進性サイトカイン（例えば、IL1A/B、CXCL2/3/8）をコードする遺伝子の中には、出生時の全ての応答の炎症促進性モジュール内の最も接続された遺伝子の中に含まれていた（データ図示せず）。要約すると、ウイルス刺激及び細菌刺激は、炎症促進性及びIFN応答遺伝子の重複するセットを活性化するが、基礎となるネットワーク構造は著しく異なっていた。

【0195】

実施例7 - 出生時及び5歳時の先天性免疫機能のマスターレギュレーターの特定

VIPER (Alvarez et al., Nat Genet, 2016, 48: 838-847) 解析を用いて、モジュール接続パターンを駆動すると予測されるマスターレギュレーターを特定した。このアプローチは、LPS誘導IFNモジュールが出生時にBATF3、STAT3及びIRF1転写因子(TF)によって推定的に駆動されたのに対し、イミキモド及びPoly(I:C)誘導IFNモジュールの上位ドライバーは、複数のSTAT(例えば、STAT2)及びIRF(例えば、IRF7)TFを含むことを明らかにした(図3B~D; 右パネル、図6B)。IRF1は、180個のLPS誘導IFNモジュール遺伝子の52個の遺伝子を調節することが見出された(表4)。3つの応答全てについての炎症促進性モジュールを、CEBPB、AP-1(例えばJUN、FOSL1)及びNF-kB(例えばNFkB2、RELB)について濃縮した(データ図示せず)。重要なことに、LPS応答IFN(169/180, 93.89%)(図7)及び炎症促進性(443/2297, 19.29%)モジュール(データ図示せず)から保存されたものみに制限された入力遺伝子を用いた反復解析では、データは変化しなかった。最後に、5歳時に収集したCMBとマッチしたPBMCサンプル(n=27)との間の遺伝子ネットワークパターンを比較した。LPS誘導IFNモジュールの接続性は、出生時と比較して5歳時で著しく高く、このモジュールの配線が発達調節の対象であることを示唆している(図3E及び3F)。加えて、IRF1濃縮は、臍帯血からのみ特定された(図3G)。対照的に、イミキモド及びPoly(I:C)刺激によって誘発されたIFN応答は、出生時と5歳時との間で比較的類似した接続性パターンを示し、これを支持して、推定されるドライバーはまた、出生時と5歳時との間で比較可能であった(例えば、STAT2、IRF7)(図3H&I、図8)。イミキモド及びpoly(I:C)炎症促進性モジュールは、出生時と比較して5歳時で採取した血液中のモジュール内接続性の低下を特徴とした(データ図示せず)。

【0196】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. I R F I レギュロンによって調節される L P S 誘導 I F N モジュール遺伝子。遺伝子記号及び E N S E M B L 受託番号を提供する。

CLEC2B ENSG00000110852	CXCL9 ENSG00000138755	ERVK-28 ENSG00000267696	FAS ENSG00000026103
FBXO6 ENSG00000116663	GBP1 ENSG00000117228	GBP1P1 ENSG00000225492	GBP2 ENSG00000162645
GBP3 ENSG00000117226	GBP4 ENSG00000162654	GBP5 ENSG00000154451	GBP6 ENSG00000183347
GPR174 ENSG00000147138	HAPLN3 ENSG00000140511	IDO1 ENSG00000131203	IFNG ENSG00000111537
IL12RB1 ENSG00000096996	IL15 ENSG00000164136	IL15RA ENSG00000134470	LINC02328 ENSG00000258733
NFIX ENSG00000008441	NLRC5 ENSG00000140853	OR2IIP ENSG00000237988	PARP3 ENSG00000041880
PLAAT4 ENSG00000133321	PSMB10 ENSG00000205220	PSMB9 ENSG00000240065	PSME1 ENSG00000092010
PSME2 ENSG00000100911	PTGES3P1 ENSG00000234518	SAMD4A ENSG00000020577	SOCS1 ENSG00000185338
STAT1 ENSG00000115415	SYNPO2 ENSG00000172403	TAPI ENSG00000168394	TAPBP ENSG00000231925
TCAF2 ENSG00000170379	TCAF2C ENSG00000283528	TCAF2P1 ENSG00000159860	TIFA ENSG00000145365
TRAFD1 ENSG00000135148	UBD ENSG00000213886	UBE2L6 ENSG00000156587	USP30-AS1 ENSG00000256262

10

20

【0197】

実施例 8 - 出生時の先天性免疫応答は、生後 1 年目の s L R I を予測する

出生時の先天性免疫応答が生後 1 年目の s L R I を予測できるかどうかを決定するために、データセットを訓練 (50%、n = 25) 及び検証セット (50%、n = 25) にランダムに割り当て、ランダムフォレスト分類器を C B M C I F N モジュールで訓練した。驚くべきことに、L P S 誘導 I F N モジュール遺伝子で訓練された分類器は、バリデーションデータセットで 72% の精度で生後 1 年目の s L R I を予測することができた (R O C 曲線下面積 = 0.724) (図 4 A、図 9)。対照的に、イミキモド又は P o l y (I : C) データから構築された分類器は、生後 1 年目の s L R I を予測しなかった (図 4 A)。予測ランダムフォレストモデルはまた、180 個の遺伝子のいくつかは他の遺伝子よりも高い精度を提供し、G i n i 係数の減少率平均 (mean decrease G i n i) 又は平均正解率減少量 (mean decrease accuracy) によって定量化されたことを示した (表 5 及び図 9 A)。G i n i 係数重要度スコアリングについては、統計的閾値 (中央値を上回る 2 つの中央値の絶対偏差) を使用して、モデルからの遺伝子が最も予測可能であるかを決定した。14 個の遺伝子がこの閾値を上回っていた (表 5)。

30

40

【0198】

50

【表 5】

表 5. L P S 誘導 I F N モジュールから G i n i 係数重要度によってスコアリングされた上位のフィルタリングされた遺伝子。

遺伝子記号	ENSEMBL ID	MeanDecreaseGini
KLHDC7B	ENSG00000130487	0.398792717
IFNG	ENSG00000111537	0.248785492
CASZ1	ENSG00000130940	0.217869997
PSMB9	ENSG00000240065	0.206963824
PARP3	ENSG00000041880	0.188704302
ACOT7	ENSG00000097021	0.187326939
NUB1	ENSG00000013374	0.182121626
USP18	ENSG00000184979	0.179460628
NLRC5	ENSG00000140853	0.173439287
CCDC194	ENSG00000269720	0.168838173
GCH1	ENSG00000131979	0.164823734
PARP11	ENSG00000111224	0.162908602
CXCL11	ENSG00000169248	0.1562304
PMAIP1	ENSG00000141682	0.156106684

10

20

30

【 0 1 9 9 】

入力として利用可能な比較的少ないサンプル数を考慮して、この所見が再現可能であるかどうかを試験するために、訓練 / 検証セットにおける対象のメンバーシップをランダムにリサンプリングすることによって解析を繰り返し、再び、L P S 誘導 I F N モジュール遺伝子のみが乳児期の s L R I を平均して偶然よりも良好に予測できることが見出された (図 1 0) 。更に、乳児期における s L R I 感受性に関して、L P S 誘導 I F N モジュールについて著しく異なる接続性パターンが観察され、これは、イミキモド又は P o l y (I : C) I F N モジュールからは明らかではなかった (図 4 B & C) 。具体的には、感受性のある個体は、L P S 誘導 I F N モジュールについてより強い遺伝子ネットワークパターンを有したが、応答の推定ドライバーは同等であった (I R F 1 、 S T A T 3 、 B A T F) (図 4 B 、 D - E (i)) 。更に、イミキモド及び P o l y (I : C) 応答を L P S 誘導 I F N モジュールのそれらの遺伝子だけに制限することは、乳児期における s L R I 感受性に関連して、接続性パターン又はドライバーにおいて顕著な差異を示さなかった (図 1 1) 。感受性のある個体の C B M C の L P S 誘導 I F N モジュールの接続性密度プロット (図 4 B) が、5 歳時 P B M C 接続性 (図 3 F) の全体的な接続性密度に類似している場合、モジュール内接続性は関連しておらず (データは図示せず) 、異なるプロセスから類似性が現れることを示唆している。モジュール固有遺伝子はまた、全体的なモジュール発現を要約し、臨床形質と相関するように計算された。データは、臍帯血 L P S 誘導 I

40

50

IFNモジュール固有遺伝子が、生後1年でsLR Iに感受性のある個体 ($p = 0.016$)、並びに5歳で喘息 ($p = 0.015$) 及び5歳現在で喘鳴 ($p = 0.02$) を有する個体を層別化したことを示した (図4F、図12)。この結果は、LPS応答にのみ有意であり、IFNモジュールに特異的であった (図4G、図12)。

【0200】

実施例9 - 外部コホートにおける出生時のインターフェロン応答の検証

培養物中でCBMCによって誘導されるIFNモジュール遺伝子発現プロファイルに関連する上記の所見が、インビボでの小児感染に対する自然発生のIFN応答を反映しているかどうかを調べるために、RF分類器をCBMCデータで訓練し、Gene Expression Omnibusからの一連の公的に利用可能なデータセットに由来するサンプルを分類するために使用した。第1のデータセットは、確定された細菌 ($n = 52$) 又はウイルス ($n = 92$) 感染症を伴う入院を必要とする発熱性疾患を有する小児 (< 17歳) 対健康な対照 ($n = 52$) からの全血遺伝子発現プロファイルを含んだ (GSE72809; Herberg et al., JAMA, 2016, 316: 835-845)。LPS及びイミキモド/Poly (I:C) データで訓練されたRF分類器は、それぞれ、細菌 ($AUC = 0.889$) 及びウイルス ($AUC = 0.874 / 0.838$) 感染を有する小児を正確に予測することが見出された (図5A~C、図13)。第2のデータセットは、急性ウイルス性細気管支炎で入院した乳児 (< 18ヶ月、 $n = 30$) 及び幼児 (18ヶ月~5歳、 $n = 32$) 由来のPBMCサンプルからなった (GSE113211; Jones et al., Am J Respir Crit Care Med, 2019, 199: 1537-1549)。刺激されておらず、イミキモド ($AUC = 0.8$) 又はPoly (I:C) ($AUC = 0.877$) 処置されたCBMCのいずれかに構築された分類器は、年齢に関係なく、マッチした回復後サンプル (無症状、感染後8.8 ± 2.5週間) と比較して、急性疾患中に収集されたサンプルを正確に層別化することができる。モデルは、乳児 ($AUC = 0.922$ 、Poly (I:C); $AUC = 0.827$ 、イミキモド) 及び小児 ($AUC = 0.789$ 、Poly (I:C); $AUC = 0.842$ 、イミキモド) 別々に良好に機能した (データ図示せず)。第3のデータセットは、ウイルス関連又は非ウイルス「風邪」様疾患 (発症後1~6日) を有する喘息小児 (6~17歳) の研究来院からの鼻由来遺伝子発現プロファイルからなり、そのうちのいくつかは後に増悪を経験した ($n = 83$, 58人はウイルス陽性であった) (GSE115770; Altman et al., Nat Immunol, 2019, 20: 637-651)。呼吸器ウイルス感染症を有する症候性小児は、症候性であるがウイルス陰性であるイミキモド ($AUC = 0.8$) 及びPoly (I:C) ($AUC = 0.832$) によって定義されたRF分類器 (図5E) の小児から正確に予測された。更に、その後増悪を経験したウイルス陽性喘息児とウイルス陰性喘息児とを同等の精度で分類した (症状発症から10日以内) (データ図示せず)。同じ研究では、ウイルス性増悪対非ウイルス性増悪の末梢血由来遺伝子発現プロファイルを、Poly (I:C) 定義分類器 ($AUC = 0.627$) よりもイミキモド ($AUC = 0.671$) からより正確に分類した (データ図示せず)。しかしながら、このコホートにおける血液発現プロファイルからの増悪とは無関係にウイルス陽性対ウイルス陰性喘息を予測するときの性能は悪かった (データ図示せず)。

【0201】

実施例10 - マルチオミクス統合

最後に、マルチオミクスデータの統合 (DIABLO; Singh et al., Bioinformatics, 2019, 35: 3055-3062) を用いて、sLR Iリスクを付与する生物学的層にわたる相関分子特徴を特定した。入力データは、CBMCベースライン免疫細胞型比率 ($n = 8$)、可変mRNA転写物 ($n = 6353$)、VIPER由来レギュロン活性スコア ($n = 1224$)、及びサイトカイン/ケモカインタンパク質 ($n = 39$) からなる。データは、T細胞、単球及びDC細胞型、免疫 (HOXB4、NFIX) 調節因子、並びに炎症促進性サイトカイン/ケモカイン (IL-1、M

I P 1、M I F) と組み合わせて、L P S 誘導 I F N シグナル伝達転写物 (I R F 9、S T A T 1、G B P 2 / 4) 及び I R F 1 活性が、生後 1 年目における s L R I のリスクの主要な決定要因であることを強化した (データは示されていない)。臍帯血から採取された B 細胞及び T 細胞も、L P S によって刺激されたときの I R F 1 及び S T A T 1 の上方制御によって示されるように、I F N シグナルの供給源であることが示された (図 1 5)。L P S 刺激された単球 / 樹状細胞及び N K 細胞は、これらの遺伝子を上方制御しなかった (データ図示せず)。

【 0 2 0 2 】

L P S 誘導 I R F 1 活性が、ネットワーク、マスターレギュレーター、及び統合解析から別々に特定されたので、本発明者らは、I R F 1 遺伝子発現相関を更に調査した。出生時の I R F 1 遺伝子発現は、選択的 S T A T 及び I R F ファミリー転写因子 (例えば、S T A T 1、I R F 9)、炎症促進性メディエーター (例えば、I L - 1、I L - 6、C C L 3 / M I P - 1)、並びにウイルス関連受容体 (例えば、I C A M 1、I F I H 1) と正の相関があった (図 5 D ~ F)。加えて、C B M C S T A T 1 及び I F I H 1 遺伝子発現は、乳児期に s L R I に感受性であった個体の中で L P S に応答して高く、I F I H 1 発現は、I R F 1 及び S T A T 1 発現と相関した (図 1 4)。

【 0 2 0 3 】

要約すると、重度のウイルス性下気道感染症 (s L R I) は、乳児及び小児の入院の主な原因であり、その後の喘息発症の主要な危険因子を構成する。細菌及びウイルス病原体が相互作用して s L R I の病因を駆動することがますます認識されているが、根底にある先天性免疫機構はよく理解されていない。この知識のギャップに対処するために、本明細書の実施例に記載されるように、出生時の細菌 (L P S / T L R 4) 及びウイルス (P o l y (I : C) / T L R 3 ; イミキモド / T L R 7) 刺激に対する自然免疫応答を系統的にプロファイルし、生後 1 年目における s L R I に対する感受性に関連する応答パターンを調査するために、マルチオミクス手法を用いた。データは、刺激のパネルに対する先天性免疫応答が重複する炎症促進性及び I F N 媒介性遺伝子発現プログラムを含んでいたが、L P S は P o l y (I : C) / イミキモド応答プロファイルではなく、s L R I を予測していたことを示した。更に、感受性は、I F N 遺伝子のネットワークの活性化によって決定され、臍帯血 L P S 応答におけるこのネットワークの接続性パターンは、s L R I のリスクにある乳児の間で著しく誇張された。更に、これらの遺伝子の接続性パターンは、コードと 5 歳 L P S 応答との間でも非常に多様であり、s L R I リスクを決定するのと同じメカニズムが発達調節の対象であることを示唆している。これらの所見は、L P S 誘導 I F N 応答に特異的であり、T L R 3 / 7 刺激によって誘発される I F N 応答についても、試験した応答の炎症促進性遺伝子からも観察されず、乳児期の s L R I のリスクが高い小児では、L P S 応答の配線が特異的に変化していることを示唆している。L P S 誘導 I F N モジュールの発現は、軽度 (非喘鳴性 / 非発熱性) の下気道感染症に関連しておらず、これらの所見が感染の重症度に特異に関連していることを強調していることは注目値する。マスターレギュレーター解析は、I R F 1 を出生時に L P S 誘発 I F N 応答の主要なドライバーとして特定した。5 歳までに、I R F 1 の推定活性は、I R F 7 を含む I R F 転写因子ファミリーの他のメンバーに置き換えられた。対照的に、I R F 7 は、出生時及び 5 歳時の T L R 3 / 7 I F N 応答の優位なドライバーであった。最後に、D I A B L O を用いて、炎症促進性サイトカイン及び免疫調節因子に関連する I R F 1 調節及び I F N 遺伝子を特徴とする s L R I リスクに関連するマルチオミクスシグネチャーを特定した。要約すると、我々の知見は、生後 1 年における s L R I への感受性は、主に抗細菌対抗ウイルス先天性免疫経路によって決定され、早期介入のリスクのある乳児を特定するための根拠を提供し、薬物開発の標的を特定することを示唆している。

【 0 2 0 4 】

乳児期におけるライノウイルス誘発性喘鳴の再発エピソードは、C A S (K u s e l e t a l . , J A l l e r g y C l i n I m m u n o l , 2 0 0 7 , 1 1 9 : 1 1 0 5 - 1 1 1 0) 及び C O A S T (J a c k s o n e t a l . , A m J R e s

10

20

30

40

50

pir Crit Care Med, 2008, 178:667-672)を含む前向きコホート研究から実証されているように、早期発症喘息の最初の徴候であることが多い。しかしながら、ウイルス感染症は、重篤な症状がない喘息の小児で日常的に検出され、早期生涯にわたって再発性sLRIは単独では喘息発症を促進するのに十分ではなく、追加の疾患補因子の関与を示唆している。これに関して、本明細書に提示されるデータは、病原性細菌に対する応答が、ウイルス刺激に対する応答よりもsLRI感受性のより重要な決定要因であることを示唆する。特に、生後5年にわたって、気道マイクロバイームにおけるこれらの細菌群集の豊富さの増加へのシフトは、ウイルス検出又は呼吸器症状の発症に先立つことがしばしば示されている。これは、病原性細菌の存在が、その後のウイルス感染中に重篤な症状を発現するために気道を「プライミング」する可能性があることを示唆している。

10

【0205】

本研究は、増強されたLPS誘導IFN応答/出生時の遺伝子ネットワーク接続パターンが、乳児におけるウイルスsLRIのリスクを付与したことを見出し、これは、IFN応答が急性ウイルス感染中にほぼ普遍的に保護的であることを考えると驚くべきものである。本研究では、システム生物学を使用して、IRF1をLPS誘導IFNネットワークのマスターレギュレーターとして特定した。IRF1は、ベースラインでのインターフェロン媒介抗ウイルスプログラムの構成的発現、及び呼吸器ウイルス感染によって誘発されるこれらのプログラムの誘導性発現を促進する。しかしながら、IRF1は、インターフェロンプログラムの誘導に不可欠ではなく、抗ウイルス免疫において不可欠ではなく相補的な役割を提供する。本明細書に記載される実施例は、出生時のLPS誘導IRF1遺伝子発現が、異なるIFNシグナル伝達メディエーター(例えば、STAT1が、JAK1/TYK2ではない)、並びに炎症促進性遺伝子/サイトカイン発現(例えば、CXCL9/10/11、IL1B)と関連することを示す(図5E~G)。これは、I型IFN活性化IRF1が特定の炎症促進遺伝子の誘導を促進するという証拠と一致する。更に、ウイルス感知及び付着関連受容体とのIRF1の会合(図5F)は、これらの受容体のIRF1制御の役割を支持し、IRF1活性化の増加が、ライノウイルス感染に対する誇張された応答のために先天性免疫系をどのようにプライミングし得るかを部分的に説明し得る。

20

【0206】

先天性免疫応答は、分子調節の複数の層にわたる複数の細胞型の協調活性によって制御される。このため、共発現特徴の統合バイオマーカープロファイルを生成して、乳児期におけるsLRIリスクに関連する総合応答を捕捉した。驚くべきことに、IFNシグナル伝達遺伝子は、臍帯血のLPS刺激後に選択されたマルチオミクスリスクプロファイルの転写物の中で顕著であり、ネットワークベースの手法(IRF1、STAT1)からの重要な所見と一致していた。重要なウイルス認識受容体MDA5をコードするIFIH1も特定された。更に、IFIH1発現は、感受性のある個体において有意に上昇し、IRF1及びSTAT1と相関しており、リスクのある個体がTLR4活性化時に重要なウイルス感知受容体を調節不全にする可能性があることを示唆している。DC交差提示によるCD8⁺T細胞の活性化に重要であるMHCクラスI調節(NLR5、RFX5)を含む、他の重要なIRF1依存性先天性経路は、データにおいて明らかである。選択されたサイトカインの中で、IL-1は特にIFN関連転写物に強く関連しており、TLR4活性化の下流に関連する抗ウイルス及び炎症誘発応答プログラムを強調している。最後に、乳児におけるsLRIリスクの統合プロファイルで選択された多くの特徴は、喘息に直接関連している。これらには、喘息リスク遺伝子(IRF1、P2RY14、ABO)の転写物、及びリモデリング(MMP7)、気道炎症(NLR5)、Th2調節異常(LGALS3BP)、並びに細胞型(T細胞、単球/DC、pDC、及びサイトカイン(例えば、IL-1、IL-16、MIF))に關与する特徴が含まれる。本明細書で使用される教師付きデータ統合アプローチは、生物学的層にわたってリスクプロファイルを拡張する。これは、複数の生物学的レベルから意味のある情報を抽出する統合マルチオミクス法

30

40

50

のユニークな能力を強調している。

【0207】

この研究は、単一の出生コホートにおけるCBMC自然免疫応答に焦点を当て、新生児の免疫系が生後最初の数週間及び数ヶ月で劇的な発達変化を受けることを考慮すると、CBMC応答が小児期に後の年齢で発生する感染症に対する免疫応答を反映する程度に疑問を呈することは有効である。この問題に対処するために、ランダムフォレスト分類器を提供されたインビトロデータで訓練し、外部コホートから得られた感染関連宿主応答データに適用した。LPS又はイミキモド/Poly(I:C)刺激後に誘導されたIFN応答を使用して、現在の細菌及びウイルス熱性感染症で病院に来院している小児を、それぞれ全血サンプルから正確に層別化することができることを見出された。これらのデータは、本明細書に記載されるインビトロモデルがインビボでの呼吸器感染症に関連することを主張する。更に、イミキモド又はPoly(I:C)によって誘発されたCBMC応答はまた、ウイルス性細気管支炎及び血液及び気道における喘息増悪を有する乳児及び小児における呼吸器ウイルス感染症を予測し、シグネチャが循環血液気道組織間の細胞組成の変動に対してある程度堅牢であることを示唆している。また、ランダムフォレストモデルの精度は、幼児(<18ヶ月)を予測する場合、幼児(18ヶ月~5歳)と比較して高く(GSE113211; Jones et al., AM J Respir Crit Care, 2019, 199:1537-1549)又はより年長の児童(6歳~17歳)と比較して高かった(GSE115770; Altman et al., Nat Immunol, 2019, 20:637-651)。まとめると、これは、臍帯血のインビトロ調査から特定されたIFN遺伝子ネットワークが、現実世界の文脈における感染の真正な応答メディエーターであることを支持している。

10

20

【0208】

要約すると、本明細書に記載の知見は、出生時のLPS誘導IFN応答が、生後1年目のsLRIのリスクを予測し、sLRI感受性及び小児喘息発症に向けた先天性免疫軌道を修正するのに潜在的な有用性を有する細胞及び分子標的を特定することを実証する。

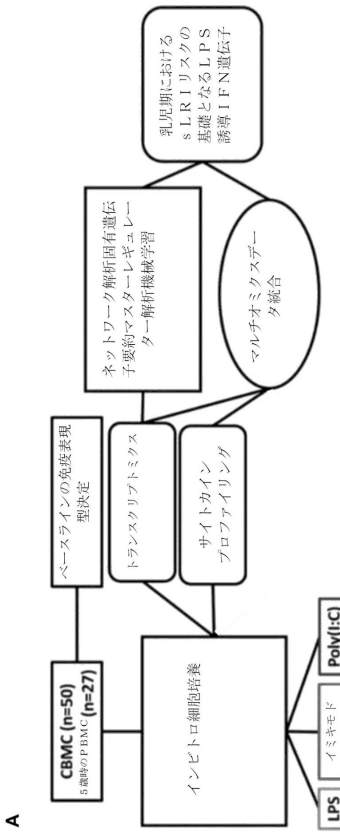
30

40

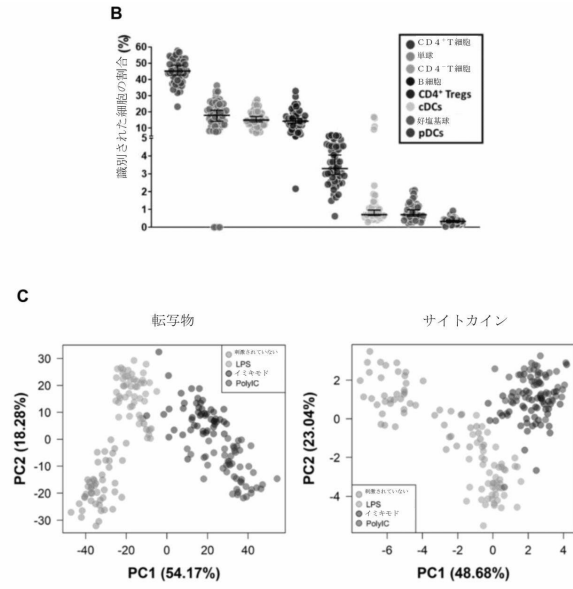
50

【 図面 】

【 図 1 - 1 】



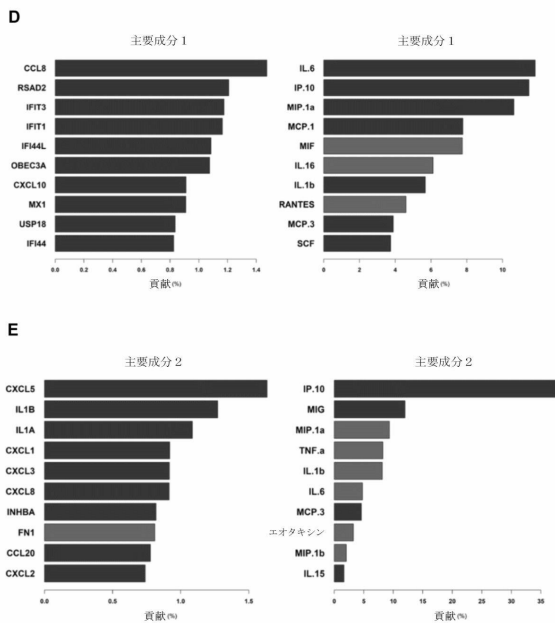
【 図 1 - 2 】



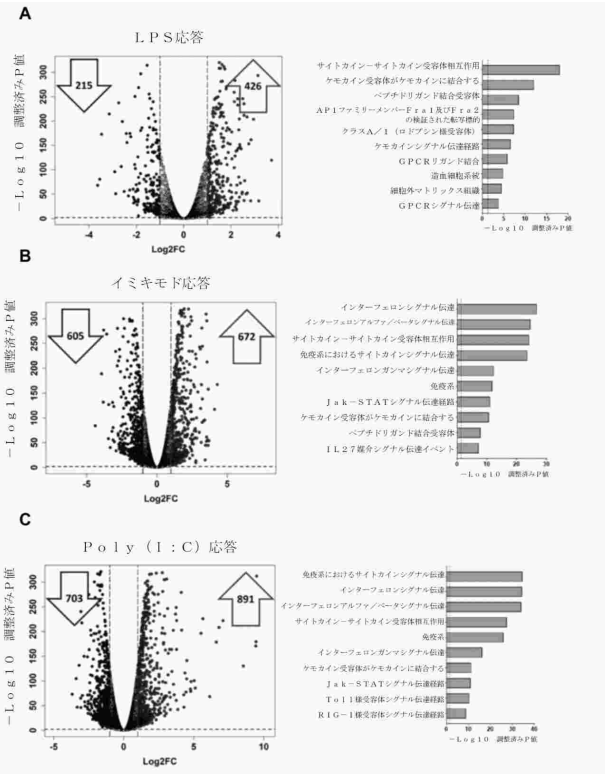
10

20

【 図 1 - 3 】



【 図 2 - 1 】

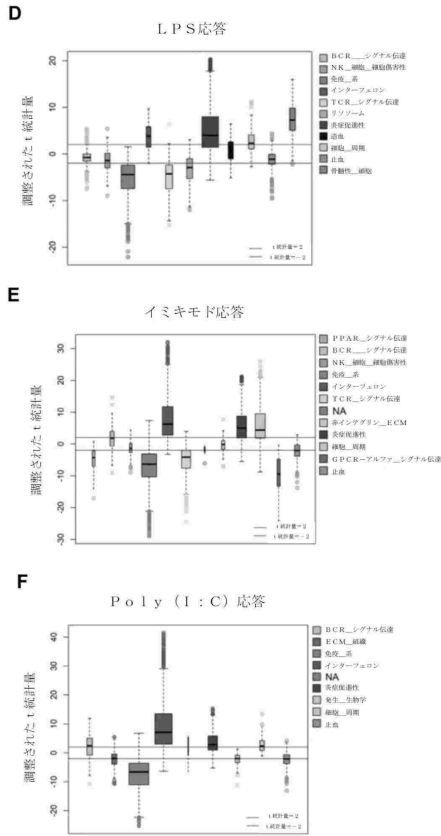


30

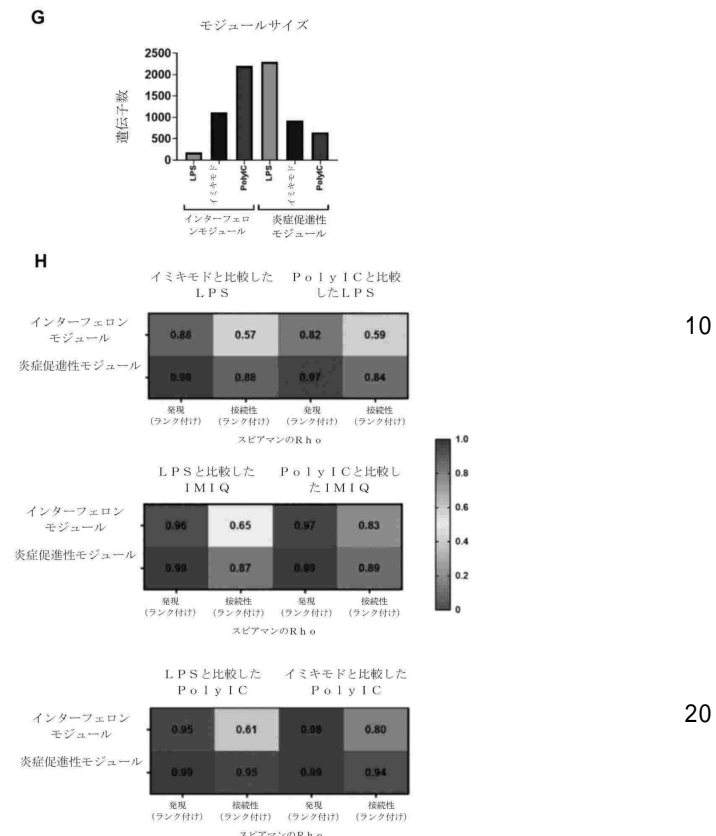
40

50

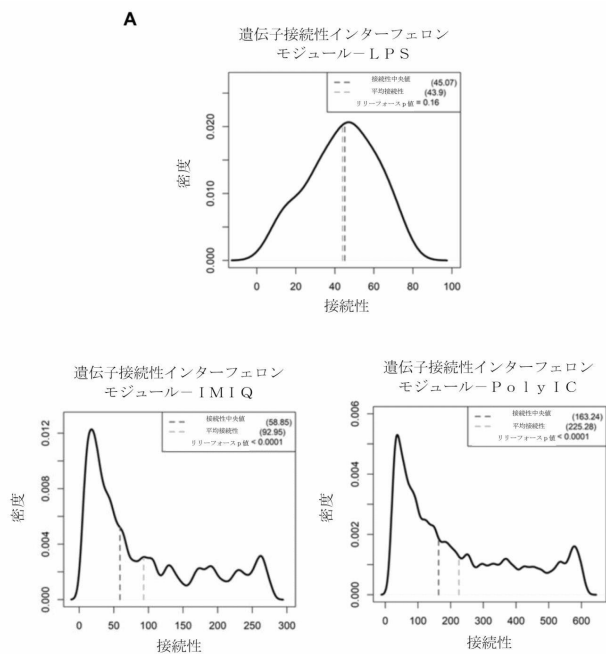
【図 2 - 2】



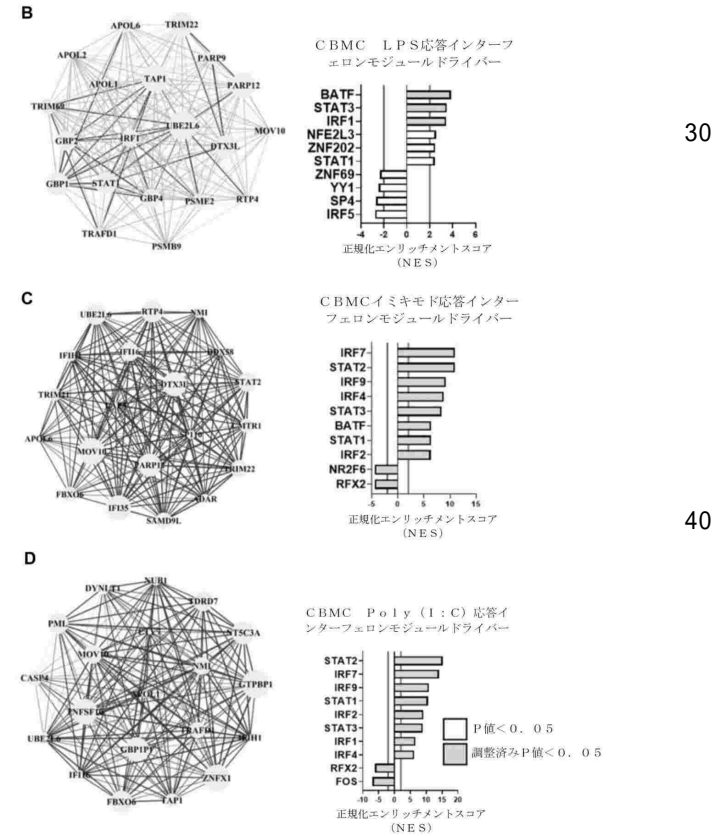
【図 2 - 3】



【図 3 - 1】



【図 3 - 2】



10

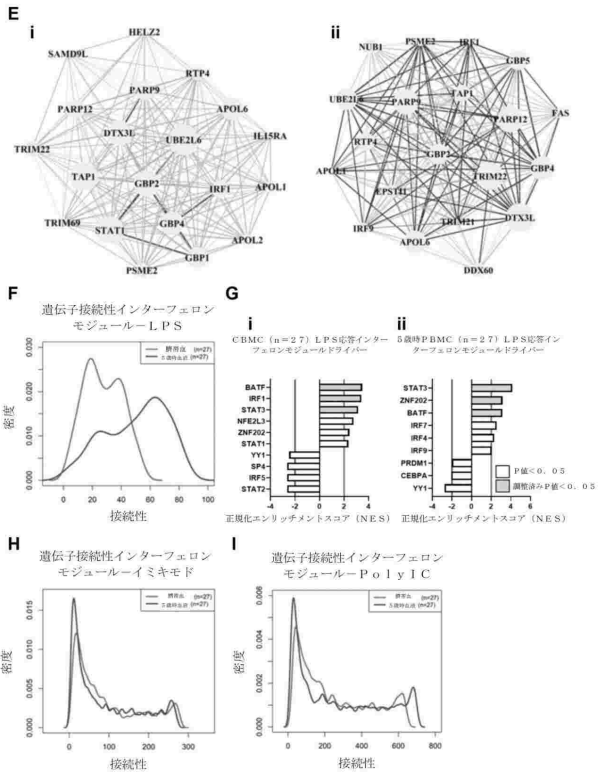
20

30

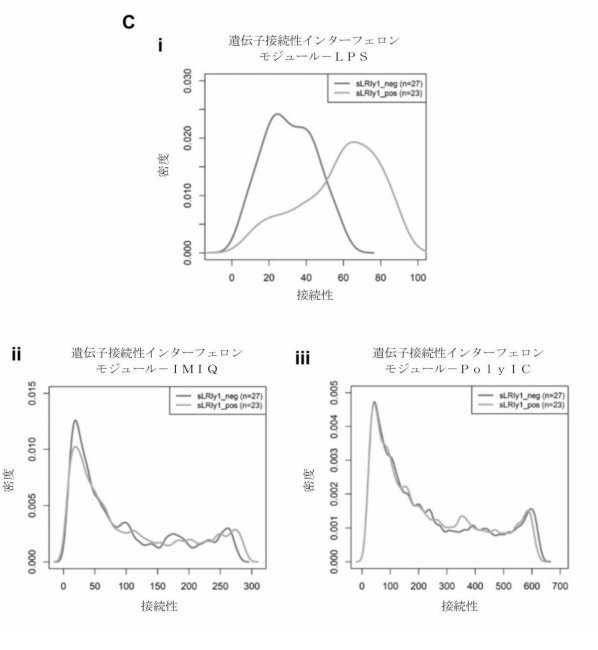
40

50

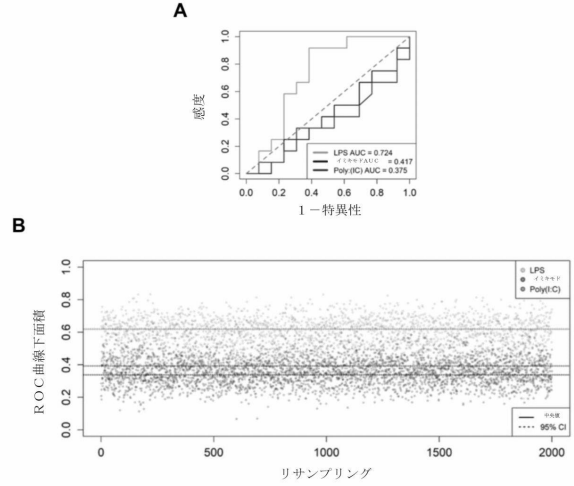
【 図 3 - 3 】



【 図 4 - 2 】



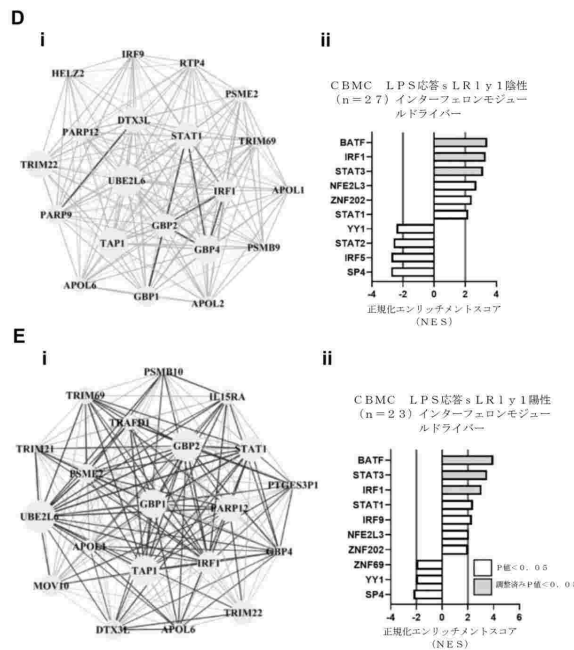
【 図 4 - 1 】



10

20

【 図 4 - 3 】

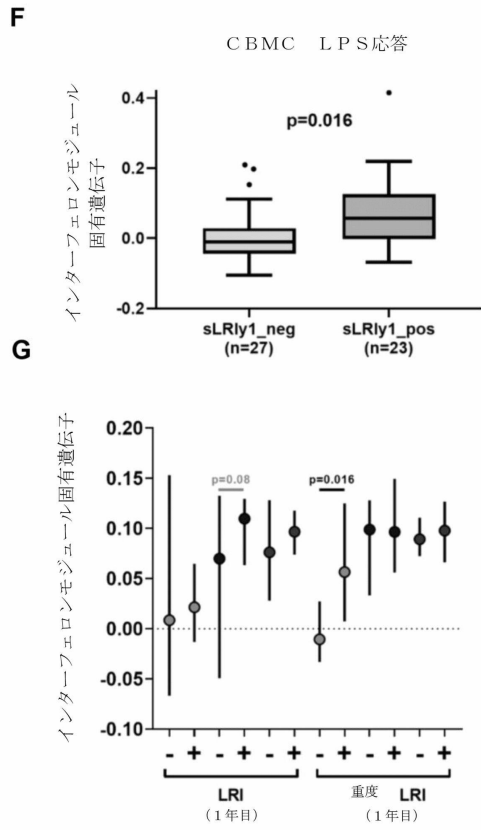


30

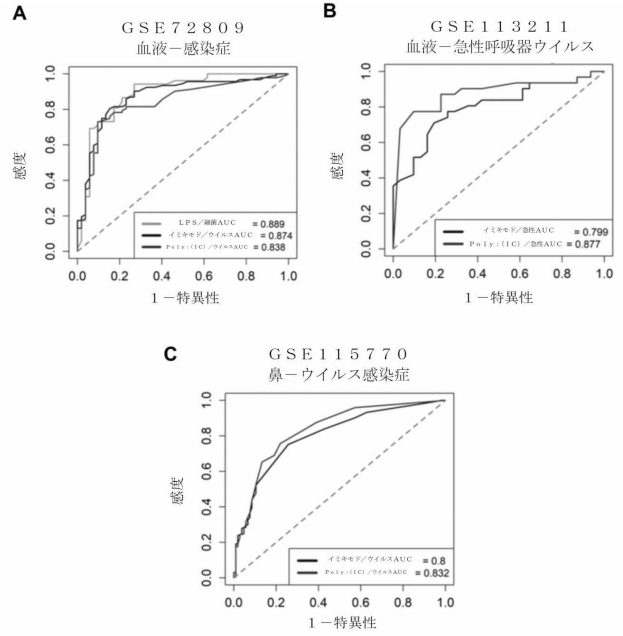
40

50

【 図 4 - 4 】



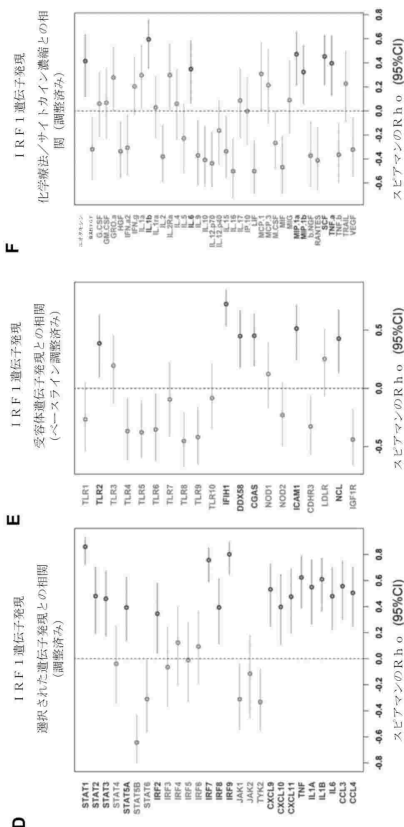
【 図 5 - 1 】



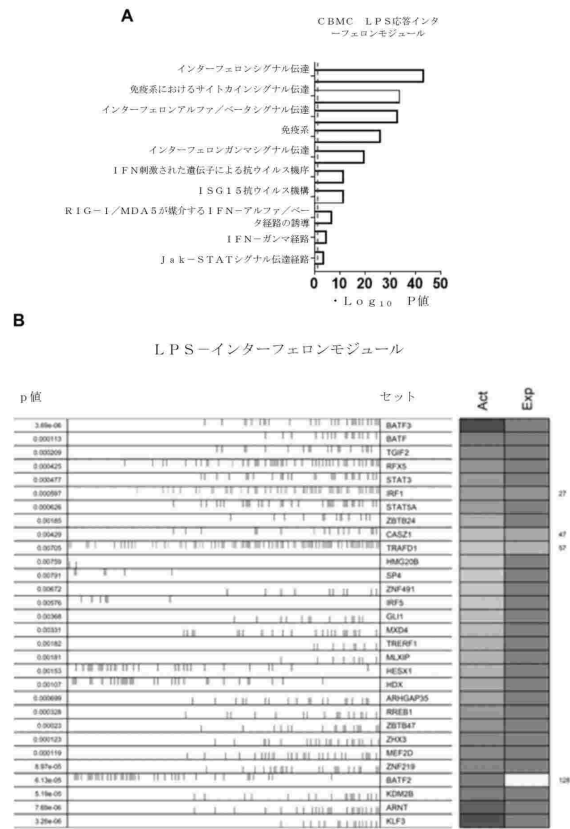
10

20

【 図 5 - 2 】



【 図 6 】

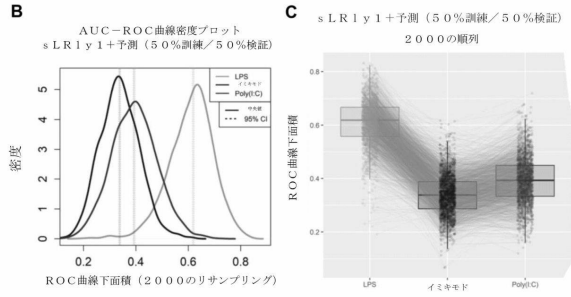


30

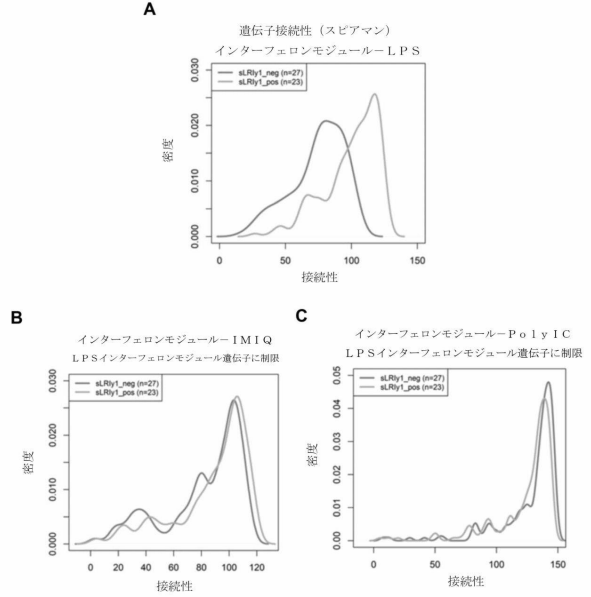
40

50

【 図 1 0 - 2 】



【 図 1 1 】



10

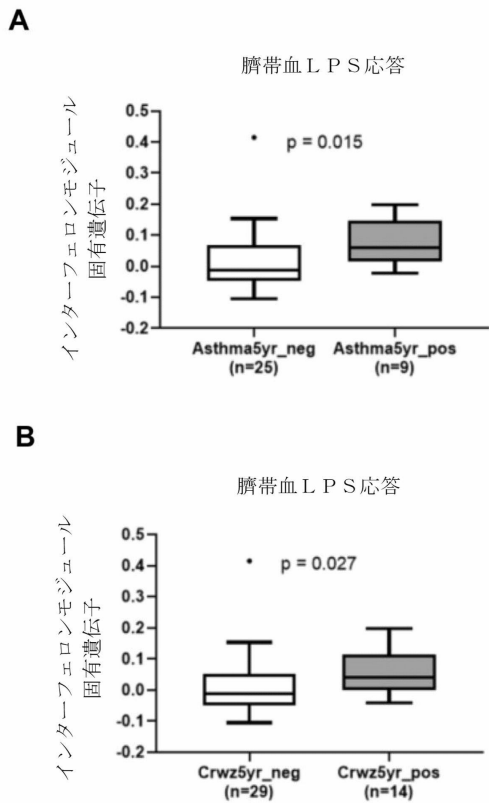
20

30

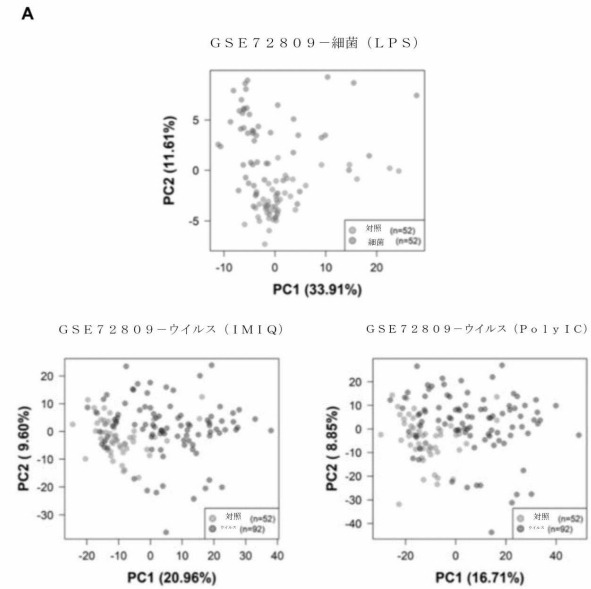
40

50

【 図 1 2 】

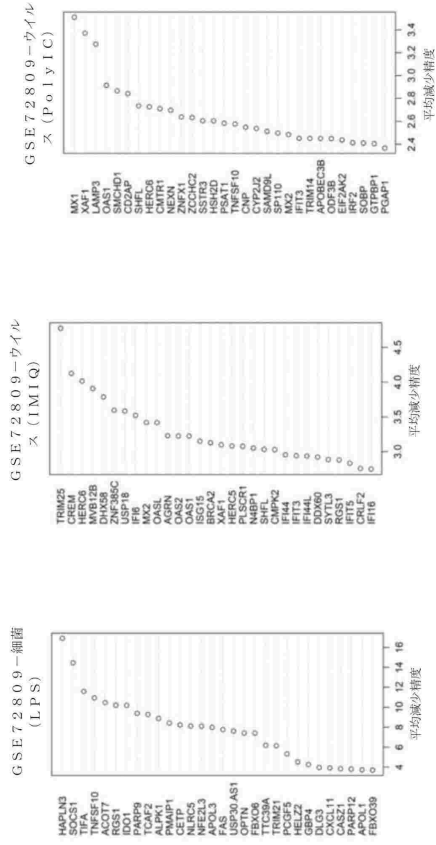


【 図 1 3 - 1 】

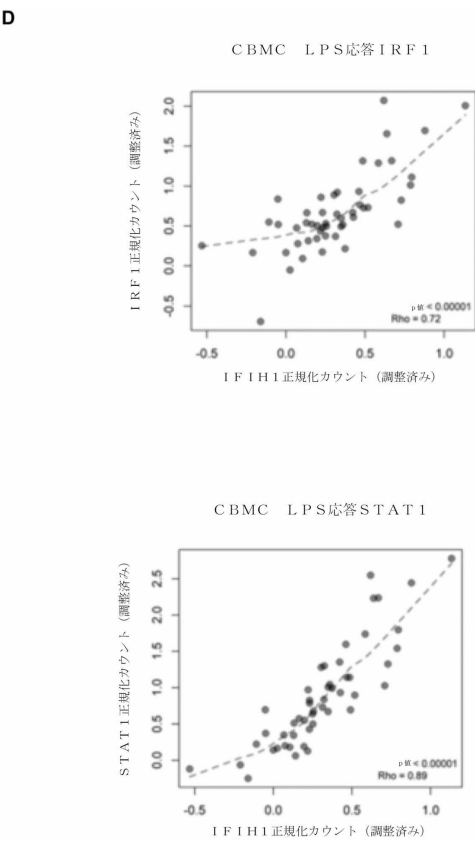


50

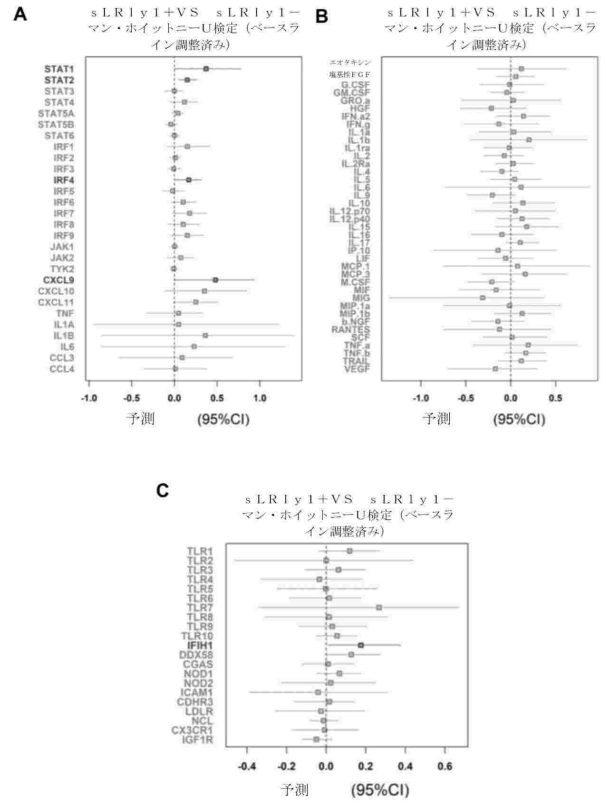
【図 13 - 2】



【図 14 - 2】



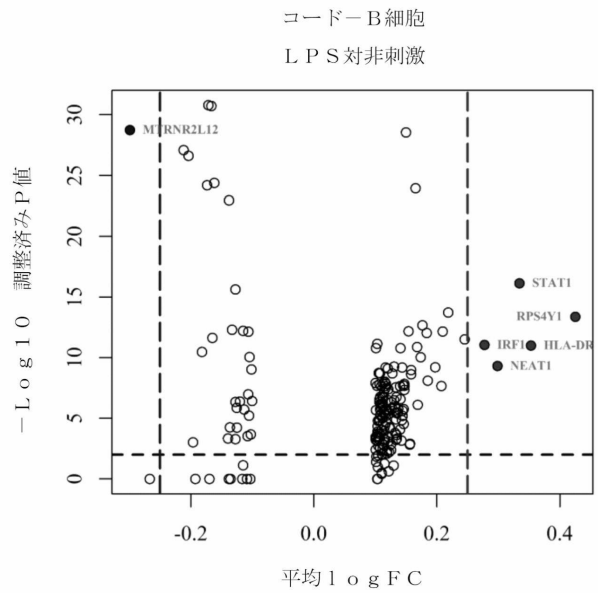
【図 14 - 1】



10

20

【図 15 - 1】



30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2022/051283
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/50 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
Google scholar: inventors names, interferon, respiratory, asthma, smoking, cystic fibrosis, TLR4, cord blood, PBMCs; Google patents: applicant and inventors names, interferon, respiratory, TLR4, cord blood; Google: interferon, respiratory, TLR4, cord blood, PBMCs, biomarkers, children, infections, predicting, mononuclear, LPS, KLHDC7B, IFNG, CASZ1, PSMB9, PARP3, ACOT7, NUB1, USP18, NLR5, CCDC194, GCH1, PARP11, CXCL11, PMAIP1 and like terms; Pubmed: articles citing "Personalized Transcriptomics Reveals Heterogeneous Immunophenotypes in Children with Viral Bronchiolitis" and "Decoding Susceptibility to Respiratory Viral Infections and Asthma Inception in Children"; STN: cord blood, mononuclear, TLR4 agonist, LPS, child, respiratory infections, asthma, cystic fibrosis, smoking, interferon, and like terms; EPOQUE: G01N2800/12, G01N2800/38, G01N2800/50, cord blood, mononuclear, TLR4 agonist, LPS, child, respiratory infections, asthma, cystic fibrosis, smoking, interferon, and like terms; IP Australia internal databases: Applicant and inventors names.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Documents are listed in the continuation of Box C		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application earlier application or patent but published on or after the international filing date "E" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 November 2022		Date of mailing of the international search report 09 November 2022
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaaustralia.gov.au		Authorised officer Joan Holgate AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6283 2671

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2022/051283	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
End of Annex			

10

20

30

40

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	S
A 6 1 K 31/573 (2006.01)	A 6 1 K 31/573	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	P
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N 33/68	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,I
T,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,
MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

オーストラリア国 6 1 6 3 ウェスタン・オーストラリア, スペアウッド, ロッキンガム・ロード
1 / 2 3 5, レスピラディグム・プロプライエタリー・リミテッド

(72)発明者 リード, ジェームズ

オーストラリア国 6 1 6 3 ウェスタン・オーストラリア, スペアウッド, ロッキンガム・ロード
1 / 2 3 5, レスピラディグム・プロプライエタリー・リミテッド

F ターム (参考) 2G045 CA30 DA13 DA14 DA36
4B063 QA01 QA13 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR43
QR45 QR55 QR62 QR72 QR77 QS25 QS34 QS36 QX01
4C085 AA14 CC23 EE01 EE03
4C086 AA01 AA02 DA10 MA01 MA04 NA05 ZA59 ZB33