



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103547680 B

(45)授权公告日 2017.05.24

(21)申请号 201180067082.6

(22)申请日 2011.12.09

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103547680 A

(43)申请公布日 2014.01.29

(30)优先权数据
61/421628 2010.12.09 US
61/452157 2011.03.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.08.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/064216 2011.12.09

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/079010 EN 2012.06.14

(73)专利权人 白细胞介素遗传学公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 K.S.科恩曼 X.吴 H-Y.王
J.罗古斯

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 林毅斌 万雪松

(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)

(56)对比文件
US 2005282198 A1,2005.12.22,权利要求
12,说明书第[0018],[0155]段.

US 2008118920 A1,2008.05.22,权利要求
49,说明书第[22],[102],[120],[245]段.

W0 2005108619 A2,2005.11.17,实施例10-
11,权利要求12,说明书第[0023]-[0025]、
[0106]-[0260]段.

Kyung-A Lee,et al.Novel interleukin 1
 β polymorphism increased the risk of
gastric cancer in a Korean population.《J
Gastroenterol》.2004,第39卷429-433.

审查员 毛颖

权利要求书1页 说明书15页

(54)发明名称

用于确定牙周病的严重性和进展的改进方
法和试剂盒

(57)摘要

确定患者是否倾向于患有重度牙周病和/或
具有高风险的牙周病进展的改进方法和试剂盒,
其包含以下步骤:(i)从所述患者采集生物样本;
(ii)针对包含IL 1B (rs16944)、IL 1B
(rs1143623)和IL 1B (rs4848306)的遗传多态
性模式将所述生物样本基因分型;和(iii)将所
述遗传多态性模式与参照的复合基因型模式相
比较;其中所述的遗传多态性模式与所述的参照
模式的相似性显示所述患者患有重度牙周病和/
或具有高风险的牙周病进展的倾向。

1. 引物在制备用于确定患者是否倾向于患重度牙周病和/或具有高风险的牙周病进展的试剂盒中的用途,所述确定包括以下步骤:

(i) 从所述患者采集生物学样本;

(ii) 从所述生物学样本分离核酸样本;

(iii) 使所述核酸样品与引物接触,所述引物与包含单核苷酸多态性(SNP) IL1B (rs16944; C/T)、IL1B (rs1143623; G/C)、IL1B (rs4848306; C/T)和IL1B (rs1143633; G/A)的IL1B基因座单倍型的等位基因特异性杂交;

(iv) 检测每一个所述SNP IL1B (rs16944; C/T)、IL1B (rs1143623; G/C)、IL1B (rs4848306; C/T)和IL1B (rs1143633; G/A)的等位基因1和等位基因2的拷贝数,

(v) 基于步骤(iv)检测的等位基因,针对包含IL 1B (rs16944)、IL 1B (rs1143623)、IL 1B (rs4848306)和IL1B (rs1143633)的遗传多态性模式对所述核酸样本进行基因分型;和

(vi) 将所述遗传多态性模式与参照复合基因型模式相比较,其中所述遗传多态性模式与所述参照复合基因型模式的同一性显示所述患者患重度牙周病和/或具有高风险的牙周病进展的倾向,其中所述参照复合基因型模式为:两个拷贝的IL1B (rs16944; C/T)等位基因2 (T)、两个拷贝的IL1B (rs1143623; G/C)等位基因2 (C)、两个拷贝的IL1B (rs4848306; C/T)等位基因1 (C)以及两个拷贝的IL1B (rs1143633; G/A)等位基因1 (G);

其中所述患者为中国人。

2. 权利要求1用途,其中所述生物学样本为唾液、口腔细胞、血液、组织样本或尿液。

3. 权利要求1的用途,其用于确定所述患者是否倾向于患重度牙周病。

4. 权利要求1的用途,其用于确定所述患者的牙周病进展的风险。

用于确定牙周病的严重性和进展的改进方法和试剂盒

[0001] 相关申请

[0002] 本专利申请要求自美国临时专利申请号61/452,157 (在2011年3月13日提交)和61/421,628 (在2010年12月9日提交)的优先权,其中每个均通过引用其整体而结合于本文中。

发明领域

[0003] 本发明总体上涉及用于确定患者的重度牙周病风险和/或牙周病进展的风险的改进方法和在所述改进方法中使用的试剂盒。

[0004] 发明背景

[0005] 齿龈炎为牙周病的早期阶段,其中齿龈可变成红色、肿胀并容易出血。齿龈炎通常为不痛的,如果不治疗,可发展为牙周炎,其可根据组织破坏的强度分为轻度、中度或重度。牙周炎主要为成年人疾病,通常直到35岁以后才可发觉。通常存在于牙菌斑中的细菌引起牙周病。由菌斑中的细菌产生的毒素激活人体的发炎机制和其他免疫机制,其最终导致支持牙齿的骨和齿龈组织的破坏。随着疾病进展,齿龈从牙齿脱离并且形成牙周袋,其为细菌提供了保护环境,因此导致持续循环。然而,一些位点并不持续是活性的。美国专利号5,328,829公开了通过测定位点上的白介素IL-1.β.来确定口腔内活性的牙周病位点的方法。吸烟与牙周炎患病率和严重性增加相关联。然而,非常大量的患有牙周炎的个体从未吸烟。

[0006] 在过去15年中,已证明影响儿童和青少年的某些形式的牙周炎是遗传决定的。这些在人群中具有特别低的发病率的疾病,在青春期年龄之前的某些个体和在青春期和18岁之间的其他个体中产生重度牙周炎。在那些病例中确定的遗传因素涉及非常明显的生物学机制,其很可能使个体倾向于产生多种健康问题。迄今,还没有成功地在成人形式的牙周炎中发现同型的遗传因素。

[0007] 已可对与1-2种基因有关或由其引起的疾病进行疾病预测的遗传检测(参见美国专利号4,582,788和5,110,920),一旦鉴定出基因,可确定携带给定基因的人的患疾病风险(参见例如美国专利号4,801,531、4,666,828和5,268,267)。

[0008] 已开发了遗传检测试剂盒来预测牙周病的风险,其使用人类基因组中的两处变异,一处位于IL1A基因(IL1A +4845),另一处位于IL1B基因(IL1B +3954)。具有这些基因变异的每个中的至少一个拷贝的次要等位基因(minor allele)的携带者具有增加的对牙周病的易感性。参见美国专利号5,686,246。然而,这样的检测在某些人种群体中的应用有限,并且在那些群体中该检测只能鉴定出小部分具有牙周病风险的人。有必要找到在所有人种群体中确定牙周病风险的更灵敏的方法。

[0009] 发明简述

[0010] 本发明涉及确定患者是否倾向于患有重度牙周病和/或具有高风险的牙周病进展的方法,其包括以下步骤:(i)从所述患者采集生物样本;(ii)针对包括IL 1B (rs16944)、IL 1B (rs1143623)和IL 1B (rs4848306)的遗传多态性模式对所述生物样本进行基因分型;和(iii)将所述遗传多态性模式与参照的复合基因型模式(composite genotype

pattern) 相比较;其中所述的遗传多态性模式与所述的参照模式的相似性显示所述患者患重度牙周病和/或具有高风险的牙周病进展的倾向。

[0011] 本发明还涉及用于确定患者是否倾向于患重度牙周病和/或具有高风险的牙周病进展的检测试剂盒,其包含:(i) 生物样本采集工具;(ii) 确定遗传多态性模式的工具;和(iii) 含有IL 1B (rs16944)、IL 1B (rs1143623)、IL 1B (rs4848306) 和IL 1B (rs1143633) 对照样本。

[0012] 本文引用的专利和出版物的内容和在这些专利和出版物中引用的文献的内容通过引用其许可的范围而结合于本文中。

[0013] 详述

[0014] 本发明涉及IL-1B基因中多态性的发现,其与牙周病的易感性有关联。因此,该多态性的基因型的确认为牙周病的易感性提供了有用的遗传学检测。

[0015] 如本文所用,“亚洲人”指其祖籍为亚洲国家之一的人,包括但不限于中国、印度、日本,与他们当前的居住地无关。“非洲人”指其祖籍为非洲国家之一的人,与他们当前的居住地无关。

[0016] 除非另外说明,涉及DNA技术的反应和操作按Sambrook等, 1989, 分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory Press中所述进行,其通过引用结合于本文。除非另外说明,还可使用如美国专利号4,666,828、4,801,531和5,272,057以及McDowell等, 1995中所述的方法学。通过Taqman™ 测定或使用连续单碱基延伸的PCR进行基因分型。

[0017] 本文提供确定患者是否倾向于患重度牙周病和/或具有高风险的牙周病进展的方法,其包含以下步骤:(i) 从所述患者采集生物样本;(ii) 针对包含IL 1B (rs16944)、IL 1B (rs1143623) 和IL 1B (rs4848306) 的遗传多态性模式对所述生物样本进行基因分型;和(iii) 将所述遗传多态性模式与参照的复合基因型模式相比较;其中所述的遗传多态性模式与所述的参照模式的相似性显示所述患者患重度牙周病和/或具有高风险的牙周病进展的倾向。

[0018] 本文还提供确定患者是否倾向于患重度牙周病和/或具有高风险的牙周病进展的方法,其包含以下步骤:(i) 从所述患者采集生物样本;(ii) 针对包含IL 1B (rs16944)、IL 1B (rs1143623) 和IL 1B (rs4848306) 的遗传多态性模式对所述生物样本进行基因分型,其中表4-6中所列的遗传多态性模式之一的存在显示所述患者患重度牙周病和/或具有高风险的牙周病进展的倾向。

[0019] 在一个优选的实施方案中,遗传多态性模式选自(B1B1和 IL1B3877=1.1)、B2B3、B2B4、B3B3、B3B4、B4B4、(B1B4和IL1B3877=1.1)、(B2B4和IL1B3877=1.1)、(B3B4和IL1B3877=1.1)、(B4B4和IL1B3877=1.1)、(B2B3和IL1B3877=1.1)、(B3B3和IL1B3877=1.1)、B1B1、B1B4、(B2B4和IL1B3877=2.*)、(B4B4和IL1B3877=2.*)、(B3B4和IL1B3877=2.*)、(IL1B3877=1.1和IL1B3877=1.1)、B2B2、B1B3、(B1B3和3877=1.1)、(B2B2和3877=1.1) 和IL1B3877=1.1。

[0020] 在一个优选的实施方案中,高加索人群中的遗传多态性模式选自(B1B1和IL1B3877=1.1)、B2B3、B2B4、B3B3、B3B4、B4B4、(B1B4和IL1B3877=1.1)、(B2B4和IL1B3877=1.1)、(B3B4和IL1B3877=1.1)、(B4B4和IL1B3877=1.1)、(B2B3和IL1B3877=1.1)、(B3B3和

IL1B3877=1.1)、B1B1、B1B4、(B2B4和IL1B3877=2.*)、(B4B4和IL1B3877=2.*)、(B3B4和IL1B3877=2.*)和(IL1B 3737=1.1和IL1B3877=1.1)。

[0021] 在另一优选的实施方案中,非洲人群中的遗传多态性模式选自(B1B1和IL1B3877=1.1)、B2B3、B2B4、B3B3、B3B4、B4B4、(B1B4和IL1B3877=1.1)、B1B1、(B3B4和IL1B3877=1.1)、(B3B4和IL1B3877=2.*)、(B2B4和IL1B3877=1.1)、(B4B4和IL1B3877=1.1)和(B1B4和IL1B3877=1.1)。

[0022] 在另一优选的实施方案中,中国人群中的遗传多态性模式选自B2B2、B1B3、(B1B3和3877=1.1)、(B2B2和3877=1.1)和IL1B3877=1.1。

[0023] *IL1B*单倍型的定义:

[0024] 最常见的单倍型用数字表示为如下表所述,其显示在每个SNP上的等位基因:

单倍型	IL1B(-511)	IL1B(-1464)	IL1B(-3737)
B1	1 (C)	1 (G)	2 (T)
B2	2 (T)	2 (C)	1 (C)
B3	1 (C)	1 (G)	1 (C)
B4	2 (T)	1 (G)	1 (C)

[0025] *IL1B*复合基因型的定义:

[0027] 可通过常规的等位基因定义IL1B基因的复合基因型。两种复合基因型模式作为实例显示如下。

基因型/二倍型	RS16944	RS1143623	RS4848306	RS1143633
SNP	IL-1B (-511)	IL-1B (-1464)	IL-1B (-3737)	IL-1B (+3877)
B1B1	C/C	G/G	T/T	---
B1B4+3877 1.1	C/T	G/G	C/T	G/G
B2B3	C/T	G/C	C/C	---
B2B4	T/T	G/C	C/C	---
B3B3	C/C	G/G	C/C	---
B3B4	C/T	G/G	C/C	---
B4B4	T/T	G/G	C/C	---

[0028]

基因型/二倍型	RS16944	RS1143623	RS4848306	RS1143633
SNP	IL-1B (-511)	IL-1B (-1464)	IL-1B (-3737)	IL-1B (+3877)
B1B1	C/C	G/G	T/T	---
B1B4+3877 1.1	C/T	G/G	C/T	G/G
B2B3	C/T	G/C	C/C	---
B2B4	T/T	G/C	C/C	---
B3B3	C/C	G/G	C/C	---
B3B4+ 3877 1.1	C/T	G/G	C/C	G/G
B4B4	T/T	G/G	C/C	---

[0029] 在本方法的一个优选实施方案中,生物样本选自唾液、口腔细胞、血液、组织样本和尿液。

[0030] 在另一优选实施方案中,本方法用于确定所述患者是否倾向于患重度牙周病或用于确定所述患者牙周病进展的风险。患者优选为高加索人、非洲人、中国人或其他种族。

[0031] 本发明已鉴定出在所有主要的人种群体中非常普遍的IL1 SNP和单倍型。特定的复合基因型与在高加索人、非洲裔美国人和中国人中较严重的牙周炎显著相关。由人种群之间的不同基因间的相互作用可引起的人种群之间的任何区别可有助于这些不同的发现,并且基因-环境间的相互作用在各人种群之间有所不同。

[0032] 在检测试剂盒的另一优选实施方案中,患者为高加索人、非洲人、中国人或其他人种。该试剂盒可含有一种或多种寡核苷酸,包括5'和3'寡核苷酸,其可将5'和3'与IL-1基因座单倍型的至少一个等位基因相杂交。PCR扩增的寡核苷酸使25个-2500个单独的碱基对进行杂交,优选约100个-约500个单独的碱基,以产生合适大小的PCR产物用于随后的分析。

[0033] 使用该序列信息和用于引物序列设计及优化的本领域已知的标准技术,可容易地设计用于在这些基因中检测人类多态性的合适引物。例如,可通过使用市售的引物选择程序例如Primer 2.1、Primer 3或GeneFisher完成这种引物序列的最佳设计(还可参见Nicklin M.H.J., Weith A. Duff G.W., “包含人类白介素-1 α 、白介素-1 β 和白介素-1受体拮抗物基因的区域物理图谱(A Physical Map of the Region Encompassing the Human Interleukin-1 α , interleukin-1 β , and Interleukin-1 Receptor Antagonist

Genes)” Genomics19: 382 (1995); Nothwang H.G.等, “白介素1-基因簇的分子克隆:整合YAC/PAC毗连群的构建和染色体2q13区域的部分转录图 (Molecular Cloning of the Interleukin-1 gene Cluster: Construction of an Integrated YAC/PAC Contig and a partial transcriptional Map in the Region of Chromosome 2q13)” Genomics41: 370 (1997); Clark等, (1986) Nucl. Acids. Res., 14:7897-7914 [Nucleic Acids Res.中出现出版错误, 15:868 (1987)]和在URL gdb.org上的基因组数据库(GDB)项目)。

[0034] 在试剂盒中使用的寡核苷酸可以是各种天然的和/或合成的组合物中的任何一种,例如合成的寡核苷酸、限制性片段、cDNA、合成的肽核酸(PNA)等。测定试剂盒和方法还可使用标记的寡核苷酸以使在检测中容易鉴定。可使用的标记物的实例包括放射性标记物、酶、荧光化合物、链霉抗生物素、抗生物素、生物素、磁性部分、金属结合部分、抗原或抗体部分等。

[0035] 试剂盒还任选包括DNA采样工具。DNA采样工具为本领域技术人员所熟知,可包括但不限于基质(substrate),例如滤纸、AmpliCard™ (设菲尔德大学, 设菲尔德, 英格兰 S10 2JF; Tarlow, JW等, J. of Invest. Dermatol. 103:387-389 (1994))等;DNA纯化试剂例如Nucleon™ 试剂盒、裂解缓冲液、蛋白酶溶液等;PCR试剂,例如10X反应缓冲液、热稳定聚合酶、dNTP等;和等位基因检测工具例如HinfI限制性酶、等位基因特异性寡核苷酸、用于从变干的血液中进行巢式PCR的简并寡核苷酸引物。用于进行测定的说明书(例如,书面说明书、录音、VCR、CD-ROM等)包括于试剂盒中。

[0036] 等位基因的检测

[0037] 许多方法可以用于检测人类多态性基因座上的特定等位基因。用于检测特定多态性等位基因的优选的方法部分地依赖于多态性的分子性质。例如,多态性基因座的各种等位基因形式可通过DNA的单个碱基对进行区别。这种单核苷酸多态性(或SNP)是遗传变异的主因,其包含所有已知的多态性的大约80%,且在人类基因组中其密度估计为平均1/1000个碱基对。SNP最常见是二等位基因,仅存在两种不同的形式(尽管理论上SNP有可能达到四种不同的形式,对应存在于DNA中的四种不同的核苷酸碱基)。然而,SNP在突变上比其他多态性更稳定,这使其适于关联研究,其中使用标记物和未知变体之间的连锁不平衡来对引起疾病的突变作图。此外,因为SNP通常仅有两个等位基因,所以可通过简单的加/减测定(而不是长度测量)对其进行基因分型,这使其更易于自动控制。

[0038] 多种方法可用于检测在个体中具体的单核苷酸多态性等位基因的存在。该领域的进展已提供精确、容易并便宜的大规模SNP基因分型方法。例如,最近已描述了数种新技术,包括动态等位基因特异性杂交(DASH)、微板阵列对角线凝胶电泳(MADGE)、焦磷酸测序、寡核苷酸特异性连接、TaqMan系统以及多种DNA“芯片”技术例如Affymetrix SNP芯片。这些方法需要靶基因区域的扩增,通常通过PCR进行。基于通过入侵式裂解及随后的质谱法或固定化的锁扣探针和滚环扩增而产生小信号分子,仍有其他新开发的方法可最终消除对PCR的需求。以下总结了本领域用于检测特异性单核苷酸多态性的数种方法。本发明的方法理解为包括所有可用的方法。

[0039] 在仅为阐述性的实施方案中,本发明的方法包括以下步骤:(i)从患者采集细胞样本;(ii)从样本的细胞中分离核酸(例如基因组、mRNA或两者);(iii)使核酸样本与一种或多种探针接触,所述探针使5'和3'特异性地与至少一个IL-1促炎症反应单倍型的等位基因

在可使等位基因的杂交和扩增发生的条件下杂交；和 (iv) 检测扩增产物。这些检测方案尤其可用于核酸分子的检测，即使这种分子存在量很低。

[0040] 在本发明的测定的一个优选实施方案中，通过变更限制性酶切模式来鉴定IL-1促炎症反应单倍型的等位基因。例如，将样本和对照DNA分离、扩增(任选)、用一种或多种限制性核酸内切酶消化，并且通过凝胶电泳确定片段长度大小。

[0041] 定义

[0042] 除非另外说明，本文所用的所有科技术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员的通常理解相同的含义。尽管与本文所述方法和材料类似或等同的方法和材料可用于本发明的实施或检测，但下文仍描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用其整体而结合于本文。如果有抵触，以包括定义的本发明说明书为准。另外，材料、方法和实施例仅为阐述性的，不意指限制。本发明的其他特征和优势从下面的详述和权利要求中显而易见。

[0043] 出于有助于对本文所述实施方案的理解的目的，参考优选的实施方案，并且使用特定的语言来描述同样的内容。本文所用术语仅用于描述具体的实施方案的目的，并不意指限制本发明的范围。如本发明公开全文所用，单数形式“a”、“an”和“the”包括复数涵义，除非内容明显地另有所指。因此，例如“组合物”的涵义包括这种组合物的复数形式，也包括单一的组合物；“治疗剂”的涵义为一种或多种治疗剂和/或药物和本领域技术人员已知的其等同物，等等。

[0044] 术语“等位基因”指在不同的多态性区域中存在的不同序列变体。例如，IL-1RN (VNTR) 有至少5个不同的等位基因。序列变体可以是单或多碱基改变，包括但不限于插入、缺失或取代，或者可以是可变数量的序列重复。

[0045] 术语“等位基因模式”指在一个或多个多态性区域上一个或多个等位基因的特征(identity)。例如，等位基因模式可由在多态性位点上的单等位基因组成，对于IL-1RN (VNTR) 等位基因1，其为在IL-1RN基因座的VNTR上具有至少一个IL-1 RN等位基因1拷贝的等位基因模式。或者，等位基因模式可由单多态性位点的纯合或杂合状态组成。例如，IL-1-RN (VNTR) 等位基因2，2为在IL-1RN的VNTR标记物(其对应于纯合IL-1RN (VNTR) 等位基因2状态)上有两个拷贝的第二等位基因的等位基因模式。或者，等位基因模式可由在超过一个多态性位点上的等位基因特征组成。

[0046] 术语“对照”、“对照样本”或“参照”指适于所用检测技术的任何样本。对照样本可包含所用等位基因检测技术的产物或所测试的材料。此外，对照可以是阳性或阴性对照。作为实例，当等位基因检测技术为PCR扩增及随后进行的按大小分级分离时，对照样本可包含合适大小的DNA片段。同样地，当等位基因检测技术包括突变蛋白的检测时，对照样本可包含突变蛋白的样本。然而，优选地是，对照样本包含待检测的材料。例如，对照可以是基因组DNA或IL-1基因簇的克隆部分的样本。然而，当待检测的样本为基因组DNA时，对照样本优选为高度纯化的基因组DNA样本。

[0047] 本文所用的术语“单倍型”意指一组统计学上显著水平($P_{\text{corr}} < 0.05$)的一起作为整体共同遗传的等位基因(其处于连锁不平衡中)。本文所用短语“IL-1单倍型”指IL-1基因座上的单倍型。IL-1炎性的或促炎症的单倍型指表现出增加的激动剂活性和/或降低的拮抗剂活性的单倍型。

[0048] 本文所用术语“IL-1基因簇”和“IL-1基因座”包括在2号染色体的2q13区或其附近的所有核酸,包括至少IL-1A、IL-1B和IL-1RN基因和任何其他连锁的序列(Nicklin等, *Genomics* 19: 382-84, 1994)。本文所用术语“IL-1A”、“IL-1B”和“IL-1RN”分别指编码IL-1 α 、IL-1 β 和IL-1受体拮抗剂的基因。IL-1A、IL-1B和IL-1RN的基因登记号分别是X03833、X04500和X64532。

[0049] “IL-1 X (Z) 等位基因Y”指指定Y的具体等位基因形式,其发生在基因X的IL-1基因座多态性位点上,其中X为IL-1 A、B或RN并且其定位在核苷酸Z上或其附近,其中核苷酸Z相对于具体IL-1基因X的主要转录起始位点(其为核苷酸+1)进行编号。本文还用的术语“IL-1 X等位基因(Z)”指定位在核苷酸Z上或其附近的基因X中的IL-1多态性位点的所有等位基因。例如,术语“IL-1RN (+2018) 等位基因”是指在标记物+2018上的IL-1RN基因的替换表示形式。“IL-1RN (+2018) 等位基因2”是指在正义链的+2018位上含有胞嘧啶(C)的IL-1RN基因的表达形式。Clay等, *Hum. Genet.* 97:723-26, 1996。“IL-1RN (+2018) 等位基因1”是指在正链的+2018位上包含胸腺嘧啶(T)的IL-1 RN基因的表达形式。当受试者具有两个相同的IL-1RN等位基因时,该受试者被称为是纯合的,或具有纯合状态。当受试者具有两个不同的IL-1RN等位基因时,该受试者被称为是杂合的,或具有杂合状态。术语“IL-1RN (+2018) 等位基因2,2”指纯合的IL-1RN (+2018) 等位基因2状态。相反地,术语“IL-1RN (+2018) 等位基因1,1”指纯合的IL-1RN (+2018) 等位基因1状态。术语“IL-1RN (+2018) 等位基因1,2”指杂合的等位基因1和2状态。

[0050] 或者,通过多态性位点的核苷酸对等位基因进行命名。例如,“IL-1RN (+2018) 等位基因T”是指在正链的+2018位上含有胸腺嘧啶(T)的IL-1RN基因的形式。

[0051] “增加的风险”指与不携带具体多态性等位基因群体的成员的疾病或病况发生的频率相比,携带该具体多态性等位基因的个体疾病或病况发生在统计学上更高的频率。

[0052] 本文所用的关于核酸(例如DNA或RNA)的术语“分离的”指与在天然来源的大分子中存在的其他DNA或RNA分别分离的分子。例如,编码受试者IL-1多肽中的一个的分离核酸优选包括不超过10千碱基(kb)的核酸序列(其天然直接位于基因组DNA中IL-1基因侧翼),更优选不超过5 kb的这种天然存在的侧翼序列,最优选少于1.5 kb的这种天然存在的侧翼序列。本文所用术语“分离的”还指基本上不含通过重组DNA技术产生的细胞材料、病毒材料或培养基的核酸或肽,或者基本上不含化学合成的化学前体或其他化学试剂的核酸或肽。此外,“分离的核酸”是指包括并非作为片段天然存在并且在天然状态下没有发现过的核酸片段。术语“分离的”在本文还指分离自其他细胞蛋白质的多肽,且意指包括纯化的和重组的多肽。

[0053] 本发明的“非人动物”包括哺乳动物例如啮齿动物、非人灵长类、绵羊、狗、牛、山羊等,两栖动物例如非洲蟾蜍(*Xenopus*)属的成员,和转基因禽类(例如鸡、鸟等)。术语“嵌合动物”在本文是指其中存在重组基因的动物,或者其中重组基因在动物的某些细胞而非所有细胞中表达的动物。术语“组织特异性嵌合动物”表示重组IL-1基因中的一种在某些组织中但不会在其他组织中存在和/或表达或破坏。术语“非人哺乳动物”指哺乳动物纲除人类以外的任何成员。

[0054] 本文所用术语“核酸”指多核苷酸或寡核苷酸,例如脱氧核糖核酸(DNA),适当的情况下为核糖核酸(RNA)。该术语还应理解为包括由核苷酸类似物(例如核酸肽)产生的RNA或

DNA类似物作为等同物,和可适用于所述实施方案中单链(正义或反义)和双链多核苷酸。

[0055] 术语“多态性”指超过一种形式的基因或其部分(例如等位基因变体)的共存。其中至少有两种不同形式(即两种不同的核苷酸序列)的基因的部分是指“基因的多态性区域”。在基因的多态性区域的特定基因序列为等位基因。多态性区域可以是单核苷酸,其性质在不同的等位基因中不同。多态性区域还可以有数个核苷酸的长度。

[0056] 术语“对疾病的倾向”,亦称对疾病的“倾向性”或“易感性”或类似的词语,意指某些等位基因据此被发现与受试者发展为特定疾病(例如牙周病)的发病率有关或为其前兆。因此,与健康个体相比较,等位基因在疾病个体中的频率为过度出现。因此,这些等位基因可甚至用在症状发生前或疾病发生前的个体中预测疾病。

[0057] 术语“野生型等位基因”指这样基因的等位基因:当该基因在受试者中存在两个拷贝时将产生野生型的表型。由于基因中的某些核苷酸变化可不影响具有两个拷贝的有核苷酸变化的基因的受试者的表型,因此特定基因可有数种不同的野生型等位基因。

[0058] 遗传筛查(亦称基因分型或分子筛查)可广泛定义为检测确定患者是否具有引起疾病状态的突变(等位基因或多态性)或者与引起疾病状态的突变“连锁”的突变。连锁是指在基因组中靠近在一起的DNA序列具有一起遗传的倾向的现象。由于共遗传的某些选择有利性,两个序列可被连锁。然而更通常地是,由于在两种多态性之间的区域内发生减数分裂重组事件相对罕见,两个多态性序列被共遗传。共遗传的多态性等位基因被称为处于彼此连锁不平衡,因为在给定的人类群体中,在群体的任何具体成员中,它们趋于两者同时存在或根本都不存在。实际上,当在给定的染色体区域中发现多个多态性为彼此连锁不平衡时,它们定义为准稳定遗传“单倍型”(quasi-stable genetic "haplotype")。相反地,在两个多态性基因座之间发生的重组事件造成它们分离到不同的同源染色体。如果在两个物理连锁的多态性之间的减数分裂重组足够频繁地发生,则这两种多态性将显示为独立分离且被称为处于连锁平衡。

[0059] 牙周病的严重性指已丧失的牙周韧带纤维的量,被称为临床附着物丧失。根据美国牙周病学会(American Academy of Periodontology),严重性分级如下:

[0060] 轻度:1-2 mm的附着物丧失

[0061] 中度:3-4 mm的附着物丧失

[0062] 重度: ≥ 5 mm的附着物丧失。

[0063] 给出下列实施例作为本发明的具体说明。然而应理解地是,本发明不限于实施例中所述的具体细节。实施例以及本说明书的其他部分中所有的份数和百分比按重量计算,除非另外说明。

[0064] 此外,说明书或下文描述或要求保护本发明各个方面的段落中记载的任何数字范围,例如表示一组具体性质、量度单位、条件、物理状态或百分比的数字范围,意指通过引用按字面意思清楚地结合于本文中,或另外意指落入该范围内的任何数字,包括包含在任何所述范围内的数字或范围的任何子集。

[0065] 术语“约”当用作变量的修饰语或者与变量联用时,意指告知本文公开的数字和范围为弹性的,并且通过本领域技术人员使用范围之外的或与单一值不同的温度、浓度、数量、含量、碳数量和性质对本发明的实施将获得所期望的结果(即确定患者患重度牙周病的风险和/或牙周病进展的风险的改进方法和在该改进方法中使用的试剂盒)。

实施例

[0066] 实施例1

[0067] 对于IL1 SNP的等位基因和单倍型频率在主要的人种群中进行交叉比较:高加索人(DARIC, N=767);非洲裔美国人(DARIC, N=156);中国人1 (N=300);中国人2 (N=1,000);和印度人(n=644)。鉴定出具有高度的多人种频率的SNP和单倍型。然后通过经对吸烟校正过的对数回归模型分析单SNP、单倍型和复合基因型与高加索人中牙周炎严重性之间的联系。然后在非洲裔美国人中评估在高加索人中与疾病有关的模式。

[0068] 在所有人种群中具有高频率的SNP包括之前在IL1B启动子中鉴定出的功能性SNP(rs16944、rs1143623、rs4848306)和另外的IL1B SNP(rs1143633)。四个IL1B启动子单倍型(B1-B4)中B3和B4占主导,其在各个人种之间具有差别很大的频率。IL1B基因中多个复合基因型与高加索人中重度牙周炎和提高的齿龈液IL1B有关。当进一步在非洲裔美国人中测试时,复合基因型B1B1或(B1B4和IL1B3877=1.1)或B2B3或B2B4或B3B3或B3B4或B4B4也明显与重度牙周炎有关(高加索人和非洲裔美国人分别为 $p=0.003$ 和 0.043)。相似的模式B1B1或(B1B4和IL1B3877=1.1)或B2B3或B2B4或B3B3或(B3B4和IL1B3877=1.1)或B4B4,也明显与重度牙周炎有关(高加索人和非洲裔美国人分别为 $p=0.009$ 和 0.044)。

[0069] 实施例2

[0070] 此为病例对照研究。用由临床附着物水平和牙周袋深度组成的复合指标定义重度牙周炎和对照。我们分析了749名高加索受试者、153名非洲裔美国人和270名中国人(见表1)。平均起来,对于本研究中检查的三个人种群,病例与对照的比率为约1:2。

[0071] 表1:研究的受试者

	病例	对照	总计
[0072] 高加索人	270	479	749
非洲裔美国人	51	102	153
中国人	89	181	270

[0073] 有11个IL-1基因确定有IL-1生物学活性。其中9个在2号染色体上成簇,其他2个定位于9号染色体和11号染色体。对于牙周组织,IL1B基因是最相关的。因此我们一开始就关注该基因。我们扫描了完整的IL1B基因区域并鉴定出4个功能性变异。它们是单核苷酸多态性或SNP。所有的四个功能性SNP位于启动子区域,在位置-31、-511、-1464和-3737。这些SNP中的两个(-31和-511)是100%一致的(concordant),并且只有一个包括于分析中。

[0074] 三个功能性SNP形成8种可能的单倍型。它们中的4种(命名为B1至B4)占在主要人种群中观察到的所有单倍型的超过95%。这4种常见的单倍型继而形成10种可能的二倍型或单倍型对。分析结果总结在表2和3中。应注意地是,这些单倍型或二倍型的频率在人种群体之间不同。

[0075] 表2:IL1B单倍型

	SNP		
	IL 1B (-511)	IL 1B (-1464)	IL 1B (-3737)
[0076] B1	1	1	2
B2	2	2	1
B3	1	1	1
B4	2	1	1

[0077] 表3: IL1B二倍型

	SNP		
	IL 1B(-511)	IL 1B (-1464)	IL 1B (-3737)
[0078] B1B1	1.1	1.1	2.2
B1B2	1.2	1.2	1.2
B1B3	1.1	1.1	1.2
B1B4	1.2	1.1	1.2
B2B2	2.2	2.2	1.1
B2B3	1.2	1.2	1.1
B2B4	2.2	1.2	1.1
B3B3	1.1	1.1	1.1
B3B4	1.2	1.1	1.1
B4B4	2.2	1.1	1.1

[0079] 这些单倍型/二倍型是功能性的,并且它们影响炎性标记物IL-1β和CRP的临床水平。例如,某些二倍型包括B3B3、B2B3和B3B4与IL-1β和CRP两者增加的水平有关。而某些二倍型包括B1B1和B1B3仅与IL-1β增加的水平有关。有趣地是,这些单倍型对IL-1β表达的影响可为含量依赖的。例如,B2单倍型与齿龈缝液中较低水平的IL-1β有关。但是在体外分析中,单倍型与最高水平的启动子活性有关。

[0080] 实施例3

[0081] 基于它们对炎性生物标记物的影响,我们发展了候选的基因型模式以检测与重度牙周炎的临床结果之间的关联。为发展这些基因型模式,我们首先选择了与较高水平的IL-1β有关的二倍型。然后根据另一种称为IL1B3877 (rs1143633)的SNP的基因型,我们改进了基因型模式。该SNP与在亚洲人群中增加的炎性标记物CRP的水平有关。

[0082] 我们检测了这些模式与三个人种群的每个中的重度牙周炎之间的关联。表4列出与高加索人中的重度牙周炎有关的模式。这些模式中的一些是类似的,且共有相同基因型的子集。对非洲裔的美国人,与重度牙周炎有关的模式列于表5中。这些模式中的一些还与高加索人中的重度疾病有关。有5种模式与中国人重度牙周炎有关,如表6所示。这些模式与在非洲裔美国人或高加索人中观察到的不同。与高加索人、非洲裔美国人和中国人中的重度牙周炎有关的复合基因型模式分别列于表4、5和6。

[0083] 表4:与高加索人中的重度牙周炎有关的复合基因型模式

IL1B 基因型模式	未校正		对吸烟校正	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
(B1B1 和 IL1B3877=1.1)或 B2B3 或 B2B4 或 B3B3 或 B3B4 或 B4B4 或(B1B4 和 IL1B3877=1.1)	1.65 (1.16-2.34)	0.0052	1.60 (1.12-2.29)	0.0093
(B1B1 和 IL1B3877=1.1)或 B2B3 或 B3B3 或(B1B4 和 IL1B3877=1.1)或(B2B4 和 IL1B3877=1.1)或(B3B4 和 IL1B3877=1.1) 或(B4B4 和 IL1B3877=1.1)	1.64 (1.14-2.34)	0.0071	1.60 (1.11-2.30)	0.011
(B2B3 和 IL1B3877=1.1)或(B3B3 和 IL1B3877=1.1)或(B3B4 和 IL1B3877=1.1)	1.72 (1.12-2.65)	0.0126	1.65 (1.07-2.55)	0.0233
B1B1 或 B3B3 或 B2B3	1.54 (1.12-2.11)	0.0075	1.50 (1.09-2.07)	0.0123
B1B1 或 B3B3 或 B3B4	1.45 (1.03-2.03)	0.0307	1.38 (0.99-1.94)	0.0615
B1B1 或(B1B4 和 IL1B3877=1.1)或 B2B3 或 B2B4 或 B3B3 或(B3B4 和 IL1B3877=1.1)或 B4B4	1.61 (1.16-2.25)	0.0043	1.56 (1.12-2.18)	0.0088
B1B1 或 B1B4 或 B2B3 或(B2B4 和 IL1B3877=2*)或 B3B3 或 B3B4 或(B4B4 和 IL1B3877=2*)	1.66 (1.20-2.31)	0.0024	1.62 (1.16-2.26)	0.0046
B1B1 或 B1B4 或 B2B3 或 B2B4 或 B3B3 或(B3B4 和 IL1B3877=2*)或(B4B4 和 IL1B3877=2*)	1.71 (1.23-2.38)	0.0014	1.68 (1.20-2.34)	0.0023
B1B1 或 B1B4 或 B2B3 或 B2B4 或 B3B3 或 B3B4 或(B4B4 和 IL1B3877=2*)	1.77 (1.27-2.47)	0.0007	1.72 (1.23-2.40)	0.0015
B1B1 或 B2B3 或(B2B4 和 IL1B3877=2*) 或 B3B3 或 B3B4 或 B4B4 或(B1B4 和 IL1B3877=1.1)	1.56 (1.12-2.17)	0.0079	1.50 (1.08-2.10)	0.016
B1B1 或 B2B3 或 B2B4 或(B3B3 或(B3B4 和 IL1B3877=2*)或 B4B4 或(B1B4 和 IL1B3877=1.1)	1.60 (1.15-2.22)	0.0051	1.56 (1.12-2.17)	0.0087
B1B1 或 B2B3 或 B2B4 或 B3B3 或 B3B4 或(B4B4 和 IL1B3877=2*)或(B1B4 和 IL1B3877=1.1)	1.68 (1.21-2.34)	0.0018	1.62 (1.16-2.26)	0.0045

[0084]

[0085]

B1B1 或 B2B3 或 B3B3 或(B1B4 和 IL1B3877=1.1)或(B2B4 和 IL1B3877=1.1)或(B3B4 和 IL1B3877=1.1)或(B4B4 和 IL1B3877=1.1)	1.64 (1.19-2.25)	0.0022	1.59 (1.16-2.19)	0.0044
B1B1 或 B3B3 或 B2B3 或 B3B4	1.61 (1.18-2.21)	0.0027	1.56 (1.14-2.14)	0.006
B2B3 或 B2B4 或 B3B3 或 B3B4 或 B4B4 或(B1B4 和 IL1B3877=1.1)	1.65 (1.15-2.36)	0.0059	1.60 (1.12-2.30)	0.0104
B2B3 或 B3B3 或(B1B4 和 IL1B3877=1.1)或(B2B4 和 IL1B3877=1.1)或(B3B4 和 IL1B3877=1.1)或(B4B4 和 IL1B3877=1.1)	1.64 (1.13-2.36)	0.008	1.60 (1.11-2.32)	0.0125
B2B3 或 B3B3 或(B3B4 和 ILB3877=1.1)	1.65 (1.12-2.43)	0.0109	1.60 (1.08-2.36)	0.0193
B2B3 或 B3B3 或 B3B4	1.69 (1.16-2.48)	0.0065	1.63 (1.11-2.40)	0.0126
B3B3 或 B2B3 或 B2B4 或 B1B1 或 B3B4 或 B4B4	1.66 (1.22-2.27)	0.0014	1.60 (1.17-2.20)	0.0033
B3B3 或 B2B3 或 B2B4 或 B1B1 或 B3B4 或 B4B4 或(B1B4 和 IL1B3877=1.1)	1.66 (1.21-2.28)	0.0015	1.61 (1.17-2.21)	0.0033
IL1B 3737=1.1 和 IL1B3877=1.1	1.53 (1.04-2.25)	0.0313	1.49 (1.01-2.19)	0.0467

[0086] 注释:

[0087] a. *意指等位基因1或等位基因2。

[0088] b. 对IL1B二倍型(B1B1、B1B2、B1B3、B1B4、B2B2、B2B3、B2B4、B3B3、B3B4和B4B4)的描述参照表3。

[0089] c. “IL1B3737=1.1和IL1B3877=1.1”意指在IL1B3737和IL1B3877基因座上都具有基因型1.1。

[0090] d. 如果在IL1B二倍型和IL1B3877基因型之间有“和”,则其意指在这两个基因座上分别具有二倍型和基因型。例如,“B1B1和IL1B3877=1.1”意指个体在IL1B启动子区携带二倍型B1B1,且在IL1B3877基因座上携带基因型1.1。

[0091] 表5:与非洲裔美国人中的重度牙周炎有关的复合基因型模式

[0092]

IL1B 基因型模式	未校正		对吸烟校正	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
(B1B1 和 IL1B3877=1.1)或 B2B3 或 B2B4 或 B3B3 或 B3B4 或 B4B4 或(B1B4 和 IL1B3877=1.1)	2.44 (1.04-5.72)	0.0038	2.28 (0.96-5.41)	0.061
B1B1 或(B1B4 和 IL1B3877=1.1)或 B2B3 或 B2B4 或 B3B3 或(B3B4 和 IL1B3877=1.1)或 B4B4	2.70 (1.10-6.60)	0.0266	2.57 (1.03-6.41)	0.0435
B1B1 或 B2B3 或 B2B4 或(B3B3 或(B3B4 和 IL1B3877=2.*)或 B4B4 或(B1B4 和 IL1B3877=1.1)	2.82 (1.11-7.19)	0.026	2.69 (1.04-6.94)	0.0408
B1B1 或 B2B3 或 B3B3 或(B1B4 和 IL1B3877=1.1)或(B2B4 和 IL1B3877=1.1) 或(B3B4 和 IL1B3877=1.1)或(B4B4 和 IL1B3877=1.1)	2.29 (0.99-5.28)	0.0497	2.15 (0.92-5.00)	0.077
B3B3 或 B2B3 或 B2B4 或 B1B1 或 B3B4 或 B4B4 或(B1B4 和 IL1B3877=1.1)	2.77 (1.10-6.98)	0.027	2.62 (1.03-6.64)	0.0428
IL1B3737=2.*和 IL1B3877=2.*	0.261 (0.082-0.837)	0.0181	0.27 (0.085-0.88)	0.0296

[0093] 注释:

[0094] a. *意指等位基因1或等位基因2。

[0095] b. 对IL1B二倍型 (B1B1、B1B2、B1B3、B1B4、B2B2、B2B3、B2B4、B3B3、B3B4和B4B4) 的描述,参照表3。

[0096] c. “IL1B3737=2.*和IL1B3877=2.*”意指在IL1B3737和IL1B3877基因座上都具有基因型2.1或2.2。

[0097] d. 如果在IL1B二倍型和IL1B3877基因型之间有“和”,则其意指在这两个基因座上分别具有二倍型和基因型。例如,“B1B1和IL1B3877=1.1”意指个体在IL1B启动子区携带二倍型B1B1,且在IL1B3877基因座上携带基因型1.1。

[0098] 表6:与中国人中的重度牙周炎有关的复合基因型模式

[0099]

IL1B 基因型模式	未校正		对吸烟校正	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
B2B2	2.03 (1.02-4.01)	0.0406	2.38 (1.10-5.17)	0.0285
B1B3 或 B2B2	2.26 (1.20-4.26)	0.0105	2.08 (1.01-4.28)	0.0472
B2B2 和 3877=1.1	2.38 (0.93-6.10)	0.0629	2.96 (1.04-8.41)	0.0414
(B1B3 和 3877=1.1)或(B2B2 和 3877=1.1)	2.65 (1.06-6.67)	0.0324	3.30 (1.19-9.13)	0.0217
IL1B3877=1.1	1.74 (0.88-3.43)	0.108	2.24 (1.03-4.86)	0.0416

[0100] 注释:

[0101] a. 对IL1B二倍型 (B1B1、B1B2、B1B3、B1B4、B2B2、B2B3、B2B4、B3B3、B3B4和B4B4) 的描述,参照表3。

[0102] b. 如果在IL1B二倍型和IL1B3877基因型之间有“和”,则其意指在这两个基因座上分别具有二倍型和基因型。

[0103] 实施例4

[0104] 为进一步测验IL-1基因变异和重度牙周炎之间的关联,我们检测了IL-1基因和牙周炎患者吸烟之间可能的相互作用。如下表7所示,一种或两种风险因素(IL-1基因型阳性或吸烟)的携带者与不携带任何这些风险因素的人相比较,其对重度牙周炎具有高度显著增加的风险。p值小于0.0001。

[0105] 表7:IL-1基因变异与吸烟相互作用影响重度牙周炎的风险

[0106]

测试组		参照		OR	P
基因型	吸烟	基因型	吸烟		
+	+	-	-	2.85(1.86-4.38)	<0.0001
基因型+和/或吸烟+		-	-	1.93(1.37-2.71)	0.0001
+	+	-	+	1.70(1.14-2.52)	0.008
+	+	+	-	1.87(1.13-3.08)	0.01
-	+	-	-	1.68(1.15-2.46)	0.007

[0107] 注释:基因型:(B1B1和IL1B3877=1.1)或(B1B4和IL1B3877=1.1)或B2B3或B2B4或B3B3或B3B4或B4B4。

[0108] 在确定这两种风险因素的影响后,我们仅在吸烟者中考虑IL-1基因型对重度牙周炎的影响。基因型阳性的吸烟者与基因型阴性的吸烟者相比较,对重度牙周炎有增加的风

险。这些发现显示IL-1基因变异与吸烟相互作用影响重度牙周炎的风险。

[0109] 总之,我们证明了在主要的人种群中特定的功能性IL-1基因变异与重度牙周炎相关联。此外,我们证实IL-1基因变异与吸烟相互作用影响重度牙周炎的风险。

[0110] 本发明实施的原理、优选实施方案和模式在前述说明书中进行了描述。然而,本文意图保护的发明不应解释为限制为已公开的具体形式,因为这些形式应被看作阐述性而非限制性。本领域技术人员可进行变化和改变而不脱离本发明的精神。