



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118804976 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 18

(21) 申请号 202280082782.0

M · C · 苏西尤

(22) 申请日 2022.12.16

(74) 专利代理机构 深圳永慧知识产权代理事务所(普通合伙) 44378

(30) 优先权数据

专利代理师 黄鑫

63/291,194 2021.12.17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2024.06.14

C12N 15/113 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 31/7088 (2006.01)

PCT/US2022/081750 2022.12.16

A61P 11/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/114969 EN 2023.06.22

(71) 申请人 雷杰纳荣制药公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 M · A · R · 费雷拉

J · E · 霍罗威茨 K · 西米诺维奇

权利要求书13页 说明书26页

G · 阿贝卡西斯 A · 巴拉斯

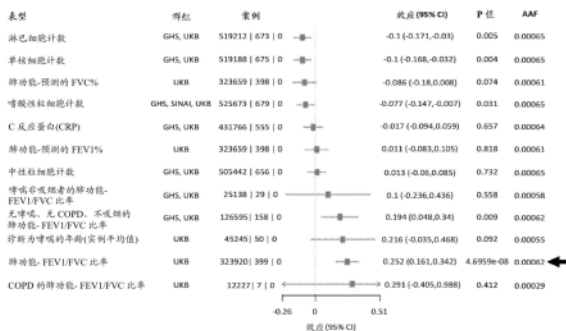
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

用整联蛋白亚基 $\alpha 1$ (ITGA1) 抑制剂治疗肺部疾患

(57) 摘要

本公开提供了治疗患有肺病诸如纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、慢性阻塞性肺病(COPD) 或哮喘或处于发展成肺病的风险下的受试者的方法,以及鉴定具有增加的发展成肺病的风险的受试者的方法。



1. 一种治疗患有纤维化肺病或处于发展成纤维化肺病的风险下的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用整联蛋白亚基 $\alpha 1$ (ITGA1) 抑制剂。

2. 一种治疗患有肺纤维化或处于发展成肺纤维化的风险下的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用整联蛋白亚基 $\alpha 1$ (ITGA1) 抑制剂。

3. 一种治疗患有间质性肺病或处于发展成间质性肺病的风险下的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用整联蛋白亚基 $\alpha 1$ (ITGA1) 抑制剂。

4. 一种治疗患有慢性阻塞性肺病 (COPD) 或处于发展成COPD的风险下的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用整联蛋白亚基 $\alpha 1$ (ITGA1) 抑制剂。

5. 一种治疗患有哮喘或处于发展成哮喘的风险下的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用整联蛋白亚基 $\alpha 1$ (ITGA1) 抑制剂。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述ITGA1抑制剂包含抑制性核酸分子。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述抑制性核酸分子包括与ITGA1核酸分子杂交的反义核酸分子、小干扰RNA (siRNA) 或短发夹RNA (shRNA)。

8. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述ITGA1抑制剂包含Cas蛋白和指导RNA (gRNA),其与ITGA1基因组核酸分子内的gRNA识别序列杂交的。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述Cas蛋白是Cas9或Cpf1。

10. 根据权利要求8或权利要求9所述的方法,其中所述gRNA识别序列包括或接近ITGA1基因组核酸分子的起始密码子或ITGA1基因组核酸分子的终止密码子。

11. 根据权利要求8或权利要求9所述的方法,其中所述gRNA识别序列位于距ITGA1基因组核酸分子的起始密码子或ITGA1基因组核酸分子的终止密码子约1000个、约500个、约400个、约300个、约200个、约100个、约50个、约45个、约40个、约35个、约30个、约25个、约20个、约15个、约10个或约5个核苷酸处。

12. 根据权利要求8或权利要求9所述的方法,其中原间隔序列邻近基序 (PAM) 序列在所述gRNA识别序列下游约2个至约6个核苷酸处。

13. 根据权利要求8至12中任一项所述的方法,其中所述gRNA包含约17个核苷酸至约23个核苷酸。

14. 根据权利要求8至12中任一项所述的方法,其中所述gRNA识别序列包含根据SEQ ID NO: 12-31中的任一个的核苷酸序列。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其还包括检测从所述受试者获得的生物样品中ITGA1变体核酸分子的存在或不存在。

16. 根据权利要求15所述的方法,其还包括向受试者施用标准剂量量的肺病治疗剂,其中所述生物样品中不存在所述ITGA1变体核酸分子。

17. 根据权利要求15所述的方法,其还包括向对于所述ITGA1变体核酸分子是杂合的受试者施用与标准剂量量相同或低于标准剂量量的剂量量的肺病治疗剂。

18. 根据权利要求15至17中任一项所述的方法,其中所述ITGA1变体核酸分子选自5:52920430:C:T、5:52944942:G:T、5:52910243:G:T、5:52918899:G:C、5:52918730:A:T、5:52952404:CA:C、5:52861561:T:C、5:52939693:T:C、5:52910201:C:T、5:52788416:T:C、5:52788356:G:A、5:52893783:G:T、5:52920332:AT:A、5:52952436:GA:G、5:52939945:G:T、5:

52925371:C:T、5:52939690:TG:T、5:52898385:T:C、5:52897529:GT:G、5:52937490:C:G、5:52947412:CT:C、5:52882022:G:T、5:52939946:T:A、5:52861503:A:AT、5:52881929:T:G、5:52932134:C:A、5:52939933:AC:A、5:52933993:C:G、5:52927645:TCCTG:T、5:52939934:CT:C、5:52893841:G:C、5:52881939:G:T、5:52932134:C:G、5:52864814:GA:G、5:52849381:C:A、5:52922818:CT:C、5:52925286:TG:T、5:52865083:G:A、5:52939606:C:CAT、5:52915509:C:CGTGGTGA、5:52865083:G:T、5:52944999:ATC:A、5:52910194:TA:T、5:52947462:G:A、5:52898323:C:T、5:52945006:GT:G、5:52910292:CT:C、5:52861560:G:A、5:52939642:G:GA、5:52864979:GC:G、5:52927590:CA:C、5:52918814:G:T、5:52788351:G:GC、5:52920469:G:A、5:52905808:A:AT、5:52922876:GT:G、5:52861501:C:CT、5:52865771:T:A、5:52947456:TGG:T、5:52918736:C:T、5:52920376:C:T、5:52915496:G:GA、5:52898346:GTC:G、5:52947462:G:T、5:52920444:C:A、5:52882022:G:A、5:52927640:TC:T、5:52925470:G:GT、5:52952430:GA:G、5:52937516:T:C、5:52915570:G:GC、5:52861530:C:A、5:52932046:G:A、5:52893841:G:T、5:52887965:TGTAA:T、5:52937399:AG:A、5:52887863:AG:A、5:52905910:T:A、5:52925304:TA:T、5:52910222:C:T、5:52887906:C:T、5:52910199:AG:A、5:52909042:G:A、5:52898269:TA:T、5:52939588:A:C、5:52937515:G:GT、5:52865745:C:A、5:52937474:GT:G、5:52925299:G:T、5:52920367:CA:C、5:52898296:CAG:C、5:52925283:CT:C、5:52893817:GAGAA:G、5:52915565:TG:T、5:52933892:A:T、5:52915524:G:T、5:52887846:C:T、5:52937515:G:A、5:52929670:GA:G、5:52915463:G:A、5:52905900:G:T、5:52865688:AG:A、5:52933993:C:A、5:52932137:G:A、5:52788355:T:C、5:52897529:G:A、5:52947344:G:A、5:52910417:CAAGT:C、5:52864772:C:A、5:52939677:C:T、5:52918807:C:A、5:52915502:TTTTG G:T、5:52893693:C:T、5:52939855:A:T、5:52925489:T:C、5:52939673:C:CA、5:52887966:G:T、5:52918877:GA:G和5:52947463:T:C。

19. 根据权利要求15至18中任一项所述的方法,其中所述检测步骤在体外进行。

20. 根据权利要求15至19中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括对所述生物样品中的所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置;

其中当所述生物样品中的所述ITGA1基因组核酸分子的所测序的部分包含含与ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸对应的位置处的核苷酸的核苷酸序列时,则所述生物样品中的所述ITGA1基因组核酸分子是ITGA1变体基因组核酸分子。

21. 根据权利要求15至19中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括对所述生物样品中的ITGA1 mRNA分子的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置;

其中当所述生物样品中的所述ITGA1 mRNA分子的所测序的部分包含含与ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸对应的位置处的核苷酸的核苷酸序列时,则所述生物样品中的所述ITGA1 mRNA分子是ITGA1变体mRNA分子。

22. 根据权利要求15至19中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括对由所述生物样品中的mRNA分子产生的ITGA1 cDNA分子的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置;

其中当所述生物样品中的所述ITGA1 cDNA分子的所测序的部分包含含与ITGA1变体核

酸分子的变体位置处的核苷酸对应的位置处的核苷酸的核苷酸序列时,则由所述生物样品中的mRNA分子产生的所述ITGA1 cDNA分子是ITGA1变体cDNA分子。

23. 根据权利要求15至19中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括:

a) 使所述生物样品与引物接触,所述引物与所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物的核苷酸序列的一部分杂交,所述部分接近对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;

b) 使所述引物至少延伸通过所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物的核苷酸序列的对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;以及

c) 确定所述引物的延伸产物是否包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸。

24. 根据权利要求15至19中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括:

a) 使所述生物样品与引物接触,所述引物与ITGA1 mRNA分子或其互补物的核苷酸序列的一部分杂交,所述部分接近对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;

b) 使所述引物至少延伸通过所述ITGA1 mRNA分子或其互补物的核苷酸序列的对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;以及

c) 确定所述引物的延伸产物是否包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸。

25. 根据权利要求15至19中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括:

a) 使所述生物样品与引物接触,所述引物与ITGA1 cDNA分子或其互补物的核苷酸序列的一部分杂交,所述部分接近对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;

b) 使所述引物至少延伸通过所述ITGA1 cDNA分子或其互补物的核苷酸序列的对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;以及

c) 确定所述引物的延伸产物是否包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸。

26. 根据权利要求20至25中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括对整个核酸分子进行测序。

27. 根据权利要求15至91中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括:

a) 扩增所述生物样品中的所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物的至少一部分,其中所述部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸;

b) 用可检测标记来标记所扩增的核酸分子;

c) 使所标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所扩增的核酸分子的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;以及

d) 检测所述可检测标记。

28. 根据权利要求15至19中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括:

a) 扩增所述生物样品中的所述ITGA1 mRNA分子或其互补物的至少一部分,其中所述部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸;

b) 用可检测标记来标记所扩增的核酸分子;

c) 使所标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中所述改变特异性探

针包含在严格条件下与所扩增的核酸分子的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核酸序列杂交的核苷酸序列;以及

d) 检测所述可检测标记。

29. 根据权利要求15至19中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括:

a) 扩增所述生物样品中的所述ITGA1 cDNA分子或其互补物的至少一部分,其中所述部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸;

b) 用可检测标记来标记所扩增的核酸分子;

c) 使所标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所扩增的核酸分子的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核酸序列杂交的核苷酸序列;以及

d) 检测所述可检测标记。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述样品中的所述核酸分子是mRNA,并且在所述扩增步骤之前将所述mRNA逆转录成cDNA。

31. 根据权利要求15至19中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括:

使所述生物样品中的所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;以及

检测所述可检测标记。

32. 根据权利要求15至19中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括:

使所述生物样品中的所述ITGA1 mRNA分子或其互补物与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所述ITGA1 mRNA分子或其互补物的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;以及

检测所述可检测标记。

33. 根据权利要求15至19中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括:

使所述生物样品中的所述ITGA1 cDNA分子或其互补物与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中所述改变特异性探针包含在

严格条件下与所述ITGA1 cDNA分子或其互补物的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;以及

检测所述可检测标记。

34. 一种用肺病治疗剂治疗受试者的方法,其中所述受试者患有纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、慢性阻塞性肺病(COPD)或哮喘,或者其中所述受试者处于发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险下,所述方法包括:

通过以下步骤确定所述受试者是否具有整联蛋白亚基 $\alpha 1$ (ITGA1)变体核酸分子:

从所述受试者获得或已经获得生物样品;以及

对所述生物样品进行或已经进行序列分析以确定所述受试者是否具有包含所述ITGA1变体核酸分子的基因型;以及

向作为ITGA1参考的受试者施用或继续施用标准剂量量的所述肺病治疗剂,和/或向所

述受试者施用ITGA1抑制剂;以及

向对于所述ITGA1变体核酸分子是杂合的受试者施用或继续施用与标准剂量量相同或低于标准剂量量的量的所述肺病治疗剂,和/或向所述受试者施用ITGA1抑制剂;

其中具有所述ITGA1变体核酸分子的基因型的存在指示所述受试者具有降低的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述受试者是ITGA1参考,并且向所述受试者施用或继续施用标准剂量量的所述肺病治疗剂,并且施用ITGA1抑制剂。

36. 根据权利要求34所述的方法,其中所述受试者对于ITGA1变体核酸分子是杂合的,并且向所述受试者施用或继续施用与标准剂量量相同或低于标准剂量量的量的所述肺病治疗剂,并且施用ITGA1抑制剂。

37. 根据权利要求34至36中任一项所述的方法,其中所述ITGA1变体核酸分子选自5:52920430:C:T、5:52944942:G:T、5:52910243:G:T、5:52918899:G:C、5:52918730:A:T、5:52952404:CA:C、5:52861561:T:C、5:52939693:T:C、5:52910201:C:T、5:52788416:T:C、5:52788356:G:A、5:52893783:G:T、5:52920332:AT:A、5:52952436:GA:G、5:52939945:G:T、5:52925371:C:T、5:52939690:TG:T、5:52898385:T:C、5:52897529:GT:G、5:52937490:C:G、5:52947412:CT:C、5:52882022:G:T、5:52939946:T:A、5:52861503:A:AT、5:52881929:T:G、5:52932134:C:A、5:52939933:AC:A、5:52933993:C:G、5:52927645:TCCTG:T、5:52939934:CT:C、5:52893841:G:C、5:52881939:G:T、5:52932134:C:G、5:52864814:GA:G、5:52849381:C:A、5:52922818:CT:C、5:52925286:TG:T、5:52865083:G:A、5:52939606:C:CAT、5:52915509:C:CGTGGTGA、5:52865083:G:T、5:52944999:ATC:A、5:52910194:TA:T、5:52947462:G:A、5:52898323:C:T、5:52945006:GT:G、5:52910292:CT:C、5:52861560:G:A、5:52939642:G:GA、5:52864979:GC:G、5:52927590:CA:C、5:52918814:G:T、5:52788351:G:GC、5:52920469:G:A、5:52905808:A:AT、5:52922876:GT:G、5:52861501:C:CT、5:52865771:T:A、5:52947456:TGG:T、5:52918736:C:T、5:52920376:C:T、5:52915496:G:GA、5:52898346:GTC:G、5:52947462:G:T、5:52920444:C:A、5:52882022:G:A、5:52927640:TC:T、5:52925470:G:GT、5:52952430:GA:G、5:52937516:T:C、5:52915570:G:GC、5:52861530:C:A、5:52932046:G:A、5:52893841:G:T、5:52887965:TGTAA:T、5:52937399:AG:A、5:52887863:AG:A、5:52905910:T:A、5:52925304:TA:T、5:52910222:C:T、5:52887906:C:T、5:52910199:AG:A、5:52909042:G:A、5:52898269:TA:T、5:52939588:A:C、5:52937515:G:GT、5:52865745:C:A、5:52937474:GT:G、5:52925299:G:T、5:52920367:CA:C、5:52898296:CAG:C、5:52925283:CT:C、5:52893817:GAGAA:G、5:52915565:TG:T、5:52933892:A:T、5:52915524:G:T、5:52887846:C:T、5:52937515:G:A、5:52929670:GA:G、5:52915463:G:A、5:52905900:G:T、5:52865688:AG:A、5:52933993:C:A、5:52932137:G:A、5:52788355:T:C、5:52897529:G:A、5:52947344:G:A、5:52910417:CAAGT:C、5:52864772:C:A、5:52939677:C:T、5:52918807:C:A、5:52915502:TTTTG G:T、5:52893693:C:T、5:52939855:A:T、5:52925489:T:C、5:52939673:C:CA、5:52887966:G:T、5:52918877:GA:G和5:52947463:T:C。

38. 根据权利要求34至37中任一项所述的方法,其中所述序列分析包括对所述生物样品中的所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置;

其中当所述生物样品中的所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物的所测序的部分包含含与ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸对应的位置处的核苷酸的核苷酸序列时,则所述生物样品中的所述ITGA1基因组核酸分子是ITGA1变体基因组核酸分子。

39. 根据权利要求34至37中任一项所述的方法,其中所述序列分析包括对所述生物样品中的所述ITGA1 mRNA分子或其互补物的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置;

其中当所述生物样品中的所述ITGA1 mRNA分子的所测序的部分包含含与ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸对应的位置处的核苷酸的核苷酸序列时,则所述生物样品中的所述ITGA1 mRNA分子是ITGA1变体mRNA分子。

40. 根据权利要求34至37中任一项所述的方法,其中所述序列分析包括对所述生物样品中的所述ITGA1 cDNA分子或其互补物的

核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置;

其中当所述生物样品中的所述ITGA1 cDNA分子的所测序的部分包含含与ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸对应的位置处的核苷酸的核苷酸序列时,则所述生物样品中的所述ITGA1 cDNA分子是ITGA1变体cDNA分子。

41. 根据权利要求34至37中任一项所述的方法,其中所述序列分析包括:

a) 使所述生物样品与引物接触,所述引物与所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物的核苷酸序列的一部分杂交,所述部分接近对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;

b) 使所述引物至少延伸通过所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物的核苷酸序列的对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;以及

c) 确定所述引物的延伸产物是否包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸。

42. 根据权利要求34至37中任一项所述的方法,其中所述序列分析包括:

a) 使所述生物样品与引物接触,所述引物与ITGA1 mRNA分子或其互补物的核苷酸序列的一部分杂交,所述部分接近对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;

b) 使所述引物至少延伸通过所述ITGA1 mRNA分子或其互补物的核苷酸序列的对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;以及

c) 确定所述引物的延伸产物是否包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸。

43. 根据权利要求34至37中任一项所述的方法,其中所述序列分析包括:

a) 使所述生物样品与引物接触,所述引物与ITGA1 cDNA分子或其互补物的核苷酸序列的一部分杂交,所述部分接近对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;

b) 使所述引物至少延伸通过所述ITGA1 cDNA分子或其互补物的核苷酸序列的对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;以及

c) 确定所述引物的延伸产物是否包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸。

44. 根据权利要求38至43中任一项所述的方法,其中所述序列分析包括对整个核酸分子进行测序。

45. 根据权利要求34至37中任一项所述的方法,其中所述序列分析包括:

a) 扩增所述生物样品中的所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物的至少一部分,其中所述部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸;

b) 用可检测标记来标记所扩增的核酸分子;

c) 使所标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所扩增的核酸分子的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核酸序列杂交的核苷酸序列;以及

d) 检测所述可检测标记。

46. 根据权利要求34至37中任一项所述的方法,其中所述序列分析包括:

a) 扩增所述生物样品中的所述ITGA1 mRNA分子或其互补物的至少一部分,其中所述部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸;

b) 用可检测标记来标记所扩增的核酸分子;

c) 使所标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所扩增的核酸分子的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核酸序列杂交的核苷酸序列;以及

d) 检测所述可检测标记。

47. 根据权利要求34至37中任一项所述的方法,其中所述序列分析包括:

a) 扩增所述生物样品中的所述ITGA1 cDNA分子或其互补物的至少一部分,其中所述部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸;

b) 用可检测标记来标记所扩增的核酸分子;

c) 使所标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所扩增的核酸分子的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核酸序列杂交的核苷酸序列;以及

d) 检测所述可检测标记。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中所述样品中的所述核酸分子是mRNA,并且在所述扩增步骤之前将所述mRNA逆转录成cDNA。

49. 根据权利要求34至37中任一项所述的方法,其中所述序列分析包括:

使所述生物样品中的所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;以及

检测所述可检测标记。

50. 根据权利要求34至37中任一项所述的方法,其中所述序列分析包括:

使所述生物样品中的所述ITGA1 mRNA分子或其互补物与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所述ITGA1 mRNA分子或其互补物的包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;以及

检测所述可检测标记。

51. 根据权利要求34至37中任一项所述的方法,其中所述序列分析包括:

使所述生物样品中的所述ITGA1 cDNA分子或其互补物与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所述ITGA1 cDNA分子或其互补物的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;以及

检测所述可检测标记。

52. 根据权利要求34至51中任一项所述的方法,其中所述核酸分子存在于从所述受试者获得的细胞内。

53. 根据权利要求34至52中任一项所述的方法,其中所述ITGA1抑制剂包含抑制性核酸分子。

54. 根据权利要求53所述的方法,其中所述抑制性核酸分子包含与ITGA1核酸分子杂交的反义核酸分子、小干扰RNA(siRNA)或短发夹RNA(shRNA)。

55. 根据权利要求34至52中任一项所述的方法,其中所述ITGA1抑制剂包含Cas蛋白和指导RNA(gRNA),其与ITGA1基因组核酸分子内的gRNA识别序列杂交。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中所述Cas蛋白是Cas9或Cpf1。

57. 根据权利要求55或权利要求56所述的方法,其中所述gRNA识别序列包括或接近对应于ITGA1基因组核酸分子的起始密码子或ITGA1基因组核酸分子的终止密码子的位置。

58. 根据权利要求55或权利要求56所述的方法,其中所述gRNA识别序列位于距对应于ITGA1基因组核酸分子的起始密码子或ITGA1基因组核酸分子的终止密码子的位置约1000个、约500个、约400个、约300个、约200个、约100个、约50个、约45个、约40个、约35个、约30个、约25个、约20个、约15个、约10个或约5个核苷酸处。

59. 根据权利要求55或权利要求56所述的方法,其中原间隔序列邻近基序(PAM)序列在所述gRNA识别序列下游约2个至6个核苷酸处。

60. 根据权利要求55至59中任一项所述的方法,其中所述gRNA包含约17至约23个核苷酸。

61. 根据权利要求55至60中任一项所述的方法,其中所述gRNA识别序列包含根据SEQ ID NO:12-31中的任一个的核苷酸序列。

62. 一种鉴定具有增加的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、慢性阻塞性肺病(COPD)或哮喘的风险的受试者的方法,所述方法包括:

确定或已经确定从所述受试者获得的生物样品中整联蛋白亚基 $\alpha 1$ (ITGA1)变体核酸分子的存在或不存在;

其中:

当所述受试者是ITGA1参考时,则所述受试者具有增加的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险;并且

当所述受试者对于ITGA1变体核酸分子是杂合或纯合的时,则所述受试者具有降低的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中所述ITGA1变体核酸分子选自5:52920430:C:T、5:52944942:G:T、5:52910243:G:T、5:52918899:G:C、5:52918730:A:T、5:52952404:CA:C、5:52861561:T:C、5:52939693:T:C、5:52910201:C:T、5:52788416:T:C、5:52788356:G:A、5:

52893783:G:T、5:52920332:AT:A、5:52952436:GA:G、5:52939945:G:T、5:52925371:C:T、5:52939690:TG:T、5:52898385:T:C、5:52897529:GT:G、5:52937490:C:G、5:52947412:CT:C、5:52882022:G:T、5:52939946:T:A、5:52861503:A:AT、5:52881929:T:G、5:52932134:C:A、5:

52939933:AC:A、5:52933993:C:G、5:52927645:TCCTG:T、5:52939934:CT:C、5:52893841:G:C、5:52881939:G:T、5:52932134:C:G、5:52864814:GA:G、5:52849381:C:A、5:52922818:CT:C、5:52925286:TG:T、5:52865083:G:A、5:52939606:C:CAT、5:52915509:C:CGTGGTGA、5:52865083:G:T、5:52944999:ATC:A、5:52910194:TA:T、5:52947462:G:A、5:52898323:C:T、5:52945006:GT:G、5:52910292:CT:C、5:52861560:G:A、5:52939642:G:GA、5:52864979:GC:G、5:52927590:CA:C、5:52918814:G:T、5:52788351:G:GC、5:52920469:G:A、5:52905808:A:AT、5:52922876:GT:G、5:52861501:C:CT、5:52865771:T:A、5:52947456:TGG:T、5:52918736:C:T、5:52920376:C:T、5:52915496:G:GA、5:52898346:GTC:G、5:52947462:G:T、5:52920444:C:A、5:52882022:G:A、5:52927640:TC:T、5:52925470:G:GT、5:52952430:GA:G、5:52937516:T:C、5:52915570:G:GC、5:52861530:C:A、5:52932046:G:A、5:52893841:G:T、5:52887965:TGTAA:T、5:52937399:AG:A、5:52887863:AG:A、5:52905910:T:A、5:52925304:TA:T、5:52910222:C:T、5:52887906:C:T、5:52910199:AG:A、5:52909042:G:A、5:52898269:TA:T、5:52939588:A:C、5:52937515:G:GT、5:52865745:C:A、5:52937474:GT:G、5:52925299:G:T、5:52920367:CA:C、5:52898296:CAG:C、5:52925283:CT:C、5:52893817:GAGAA:G、5:52915565:TG:T、5:52933892:A:T、5:52915524:G:T、5:52887846:C:T、5:52937515:G:A、5:52929670:GA:G、5:52915463:G:A、5:52905900:G:T、5:52865688:AG:A、5:52933993:C:A、5:52932137:G:A、5:52788355:T:C、5:52897529:G:A、5:52947344:G:A、5:52910417:CAAGT:C、5:52864772:C:A、5:52939677:C:T、5:52918807:C:A、5:52915502:TTTTGG:T、5:52893693:C:T、5:52939855:A:T、5:52925489:T:C、5:52939673:C:CA、5:52887966:G:T、5:52918877:GA:G和5:52947463:T:C。

64. 根据权利要求62或权利要求63所述的方法,其中所述确定步骤在体外进行。

65. 根据权利要求62至64中任一项所述的方法,其中所述确定

步骤包括对所述生物样品中的所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置;

其中当所述生物样品中的所述ITGA1基因组核酸分子的所测序的部分包含含与ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸对应的位置处的核苷酸的核苷酸序列时,则所述生物样品中的所述ITGA1基因组核酸分子是ITGA1变体基因组核酸分子。

66. 根据权利要求62至64中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括对所述生物样品中的所述ITGA1 mRNA分子或其互补物的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;

其中当所述生物样品中的所述ITGA1 mRNA分子的所测序的部分包含含与ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸对应的位置处的核苷酸的核苷酸序列时,则所述生物样品中的所述ITGA1 mRNA分子是ITGA1变体mRNA分子。

67. 根据权利要求62至64中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括对由所述生物

样品中的mRNA分子制备的ITGA1 cDNA分子或其互补物的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置;

其中当所述生物样品中的所述ITGA1 cDNA分子的所测序的部分包含与ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸对应的位置处的核苷酸的核苷酸序列时,则所述ITGA1 cDNA分子是ITGA1变体cDNA分子。

68. 根据权利要求62至64中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括:

a) 使所述生物样品与引物接触,所述引物与所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物的核苷酸序列的一部分杂交,所述部分接近对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;

b) 使所述引物至少延伸通过所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物的核苷酸序列的对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;以及

c) 确定所述引物的延伸产物是否包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸。

69. 根据权利要求62至64中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括:

a) 使所述生物样品与引物接触,所述引物与ITGA1 mRNA分子或其互补物的核苷酸序列的一部分杂交,所述部分接近对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;

b) 使所述引物至少延伸通过所述ITGA1 mRNA分子或其互补物的核苷酸序列的对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;以及

c) 确定所述引物的延伸产物是否包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸。

70. 根据权利要求62至64中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括:

a) 使所述生物样品与引物接触,所述引物与ITGA1 cDNA分子或其互补物的核苷酸序列的一部分杂交,所述部分接近对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;

b) 使所述引物至少延伸通过所述ITGA1 cDNA分子或其互补物的核苷酸序列的对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置;以

及

c) 确定所述引物的延伸产物是否包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸。

71. 根据权利要求65至70中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括对整个核酸分子进行测序。

72. 根据权利要求62至64中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括:

a) 扩增所述生物样品中的所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物的至少一部分,其中所述部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸;

b) 用可检测标记来标记所扩增的核酸分子;

c) 使所标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所扩增的核酸分子的包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;以及

d) 检测所述可检测标记。

73. 根据权利要求62至64中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括:

a) 扩增所述生物样品中的所述ITGA1 mRNA分子或其互补物的至少一部分,其中所述部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸;

b) 用可检测标记来标记所扩增的核酸分子;

c) 使所标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,

其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所扩增的核酸分子的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核酸序列杂交的核苷酸序列;以及

d) 检测所述可检测标记。

74. 根据权利要求62至64中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括:

a) 扩增所述生物样品中的所述ITGA1 cDNA分子或其互补物的至少一部分,其中所述部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸;

b) 用可检测标记来标记所扩增的核酸分子;

c) 使所标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所扩增的核酸分子的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核酸序列杂交的核苷酸序列;以及

d) 检测所述可检测标记。

75. 根据权利要求74所述的方法,其中所述样品中的所述核酸分子是mRNA,并且在所述扩增步骤之前将所述mRNA逆转录成cDNA。

76. 根据权利要求62至64中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括:

使所述生物样品中的所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所述ITGA1基因组核酸分子或其互补物的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;以及

检测所述可检测标记。

77. 根据权利要求62至64中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括:

使所述生物样品中的所述ITGA1 mRNA分子或其互补物与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所述ITGA1 mRNA分子或其互补物的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;以及

检测所述可检测标记。

78. 根据权利要求62至64中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括:

使所述生物样品中的所述ITGA1 cDNA分子或其互补物与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所述ITGA1 cDNA分子或其互补物的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;以及

检测所述可检测标记。

79. 根据权利要求62至78中任一项所述的方法,其中所述受试者是ITGA1参考,并且向所述受试者施用标准剂量量的肺病治疗剂,并且施用ITGA1抑制剂。

80. 根据权利要求62至78中任一项所述的方法,其中所述受试者对于ITGA1变体核酸分子是杂合的,并且向所述受试者施用与标准剂量量相同或低于标准剂量量的量的肺病治疗剂,并且施用ITGA1

抑制剂。

81. 一种用于治疗被鉴定为具有以下各项的受试者的肺病的肺病治疗剂:

整联蛋白亚基 $\alpha 1$ (ITGA1) 变体基因组核酸分子或其互补物,其中所述变体基因组核酸分子具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列;

ITGA1变体mRNA分子,其中所述mRNA分子具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列;或者

ITGA1变体cDNA分子,其中所述cDNA分子具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

82. 一种整联蛋白亚基 $\alpha 1$ (ITGA1) 抑制剂,其用于治疗受试者的纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、慢性阻塞性肺病 (COPD) 或哮喘,所述受试者:

a) 是ITGA1基因组核酸分子、ITGA1 mRNA分子或ITGA1cDNA分子的参考;或者

b) 对于以下各项是杂合的:

i) ITGA1变体基因组核酸分子或其互补物,其中所述基因组核酸分子具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列;

ii) ITGA1变体mRNA分子,其中所述mRNA分子具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列;或者

iii) ITGA1变体cDNA分子,其中所述cDNA分子具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

83. 根据权利要求82所述的ITGA1抑制剂,其是抑制性核酸分子。

84. 根据权利要求83所述的ITGA1抑制剂,其中所述抑制性核酸分子是与ITGA1核酸分子杂交的反义核酸分子、小干扰RNA (siRNA) 或短发夹RNA (shRNA)。

85. 根据权利要求82所述的ITGA1抑制剂,其包含Cas蛋白和指导RNA (gRNA),其与ITGA1基因组核酸分子内的gRNA识别序列杂交。

86. 根据权利要求85所述的ITGA1抑制剂,其中所述Cas蛋白是Cas9或Cpf1。

87. 根据权利要求85或权利要求86所述的ITGA1抑制剂,其中所述gRNA识别序列包括或接近ITGA1基因组核酸分子的起始密码子或ITGA1基因组核酸分子的终止密码子。

88. 根据权利要求85或权利要求86所述的ITGA1抑制剂,其中所述gRNA识别序列位于距对应于ITGA1基因组核酸分子的起始密码子或ITGA1基因组核酸分子的终止密码子的位置约1000个、约500个、约400个、约300个、约200个、约100个、约50个、约45个、约40个、约35个、约30个、约25个、约20个、约15个、约10个或约5个核苷酸处。

89. 根据权利要求85或权利要求86所述的ITGA1抑制剂,其中原间隔序列邻近基序 (PAM) 序列在所述gRNA识别序列下游约2个至约6个核苷酸处。

90. 根据权利要求85至89中任一项所述的ITGA1抑制剂,其中所述gRNA包含约17个至约23个核苷酸。

91. 根据权利要求85至89中任一项所述的ITGA1抑制剂,其中所述gRNA识别序列包含根

据SEQ ID NO:12-31中的任一个的核苷酸序列。

用整联蛋白亚基 $\alpha 1$ (ITGA1) 抑制剂治疗肺部疾患

[0001] 列表的引用

[0002] 本申请包括以电子形式作为XML文件提交的序列列表,该文件命名为381203631SEQ,创建于2022年11月30日,大小为86,876千字节。该序列列表以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本公开一般涉及用整联蛋白亚基 $\alpha 1$ (ITGA1) 抑制剂治疗患有肺病,诸如纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、慢性阻塞性肺病 (COPD) 或哮喘或处于发展成肺病的风险下的受试者,以及鉴定具有增加的发展成肺病的风险的受试者的方法。

背景技术

[0004] 纤维化肺病是进行性的和不可逆的。标准疗法仅仅是姑息性的,因为一旦受试者发展到出现症状的程度,它们就无法解决潜在的疾病机制。因此,本领域对治疗无症状受试者以及处于发展成纤维化肺病的风险下的那些受试者以预防疾病发作、延迟疾病发作或降低疾病症状的严重性的方法存在长期以来但未满足的需求。与仅姑息治疗相反,本公开的方法为无症状受试者以及处于发展成所述疾病的风险下的那些受试者提供预防性或有效治疗。

[0005] 整联蛋白亚基 $\alpha 1$ (ITGA1) 是细胞表面整联蛋白受体的组分,其与 $\beta 1$ 亚基异二聚化以形成胶原蛋白和层粘连蛋白的细胞表面受体。它识别胶原蛋白中的脯氨酸-羟基化序列G-F-P-G-E-R,并且参与EGF刺激的细胞生长的锚定依赖性负调控。它作用于细胞结合至层粘连蛋白和胶原蛋白,和神经突生长及周围神经再生。适当的胶原蛋白-整联蛋白相互作用在骨折愈合中是重要的,表明ITGA1基因参与间充质干细胞增殖和软骨形成。异二聚体受体也参与细胞-细胞粘附并且可以在炎症和纤维化中起作用。

发明内容

[0006] 本公开提供了治疗患有纤维化肺病或处于发展成纤维化肺病的风险下的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用ITGA1抑制剂。

[0007] 本公开还提供了治疗患有肺纤维化或处于发展成肺纤维化的风险下的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用ITGA1抑制剂。

[0008] 本公开还提供了治疗患有间质性肺病或处于发展成间质性肺病的风险下的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用ITGA1抑制剂。

[0009] 本公开还提供了治疗患有慢性阻塞性肺病 (COPD) 或处于发展成COPD的风险下的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用ITGA1抑制剂。

[0010] 本公开还提供了治疗患有哮喘或处于发展成哮喘的风险下的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用ITGA1抑制剂。

[0011] 本公开还提供了用肺病治疗剂治疗受试者的方法,其中所述受试者患有纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘或处于发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、

COPD或哮喘的风险下,所述方法包括:通过以下步骤确定所述受试者是否具有ITGA1变体核酸分子:从所述受试者获得或已经获得生物样品;以及对所述生物样品进行或已经进行序列分析以确定所述受试者是否具有包含所述ITGA1变体核酸分子的基因型;以及向作为ITGA1参考的受试者施用或继续施用标准剂量量的所述肺病治疗剂,和/或向所述受试者施用ITGA1抑制剂;以及向对于ITGA1变体核酸分子是杂合的受试者施用或继续施用与标准剂量量相同或低于标准剂量量的量的肺病治疗剂,和/或向受试者施用ITGA1抑制剂;其中具有所述ITGA1变体核酸分子的基因型的存在指示所述受试者具有降低的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险。

[0012] 本公开还提供了鉴定具有增加的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险的受试者的方法,所述方法包括:确定或已经确定从所述受试者获得的生物样品中ITGA1变体核酸分子的存在或不存在;其中:当所述受试者是ITGA1参考时,则所述受试者具有增加的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险;并且当所述受试者对于ITGA1变体核酸分子是杂合或纯合的时,则所述受试者具有降低的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险。

[0013] 本公开还提供了用于治疗鉴定为具有ITGA1变体核酸分子或其互补物的受试者的肺病的肺病治疗剂,其中所述变体核酸分子具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

[0014] 本公开还提供了用于治疗受试者的纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的ITGA1抑制剂,所述受试者:a)是ITGA1基因组核酸分子、ITGA1 mRNA分子或ITGA1 cDNA分子的参考;或b)对于以下各项是杂合的:ITGA1变体基因组核酸分子或其互补物;ITGA1变体mRNA分子或其互补物;或ITGA1变体cDNA分子或其互补物。

附图说明

[0015] 并入本说明书且构成其一部分的附图示出了本公开的若干特征。

[0016] 图1显示了ITGA1中<1% (M1.1)的罕见pLoF与各种免疫相关和呼吸相关的数量性状的关联。

[0017] 图2显示了ITGA1中<1% (M1.1)的罕见pLoF与各种免疫相关和呼吸相关疾病的关联。红色条指示pLoF的负荷导致更好的肺功能,以及预防哮喘和COPD的趋势。

具体实施方式

[0018] 在整个说明书和权利要求书中使用与本公开的多个方面相关的各种术语。除非另外指示,否则此类术语将被赋予其在本领域中的普通含义。其他具体定义的术语应以与本文提供的定义一致的方式解释。

[0019] 除非另外明确说明,否则决不意图将本文陈述的任何方法或方面解释为要求以特定顺序执行其步骤。因此,在权利要求书或说明书中,当方法权利要求没有确切地说明步骤是限于特定顺序时,在任何方面决非意图推断顺序。这适用于任何可能的非表达解释基础,包括相对于步骤排列或操作流程的逻辑事项、从语法组织或标点中得到的普通含义或者在说明书中描述的方面的编号或类型。

[0020] 如本文所用,除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一个(种)(a/an)”和“所述

(the)”包括复数指代物。

[0021] 如本文所用,术语“约”意指所列举的数值是近似值并且小的变化不会显著影响所公开的实施方案的实践。在使用数值的情况下,除非上下文另外指明,否则术语“约”意指数值可变化 $\pm 10\%$ 且仍在所公开的实施方案的范围内。

[0022] 如本文所用,根据需要,在特定实施方案中,术语“包含”可替换为“由……组成”或“基本上由……组成”。

[0023] 如本文所用,关于核酸分子或多肽的术语“分离的”意指核酸分子或多肽处于不同于其天然环境的条件下,诸如远离血液和/或动物组织。在一些实施方案中,分离的核酸分子或多肽基本上不含其他核酸分子或其他多肽,特别是动物来源的其他核酸分子或多肽。在一些实施方案中,核酸分子或多肽可呈高度纯化的形式,即大于95%纯或大于99%纯。当在此上下文中使用时,术语“分离的”不排除存在呈替代物理形式,例如二聚体或可替代地磷酸化或衍生化形式的相同核酸分子或多肽。

[0024] 如本文所用,术语“核酸”、“核酸分子”、“核酸序列”、“多核苷酸”或“寡核苷酸”可包括任何长度的核苷酸的聚合物形式,可包括DNA和/或RNA,并且可以是单链的、双链的或多链的。核酸的一条链还指其互补物。

[0025] 如本文所用,术语“受试者”包括任何动物,包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于农场动物(诸如例如马、牛、猪)、伴侣动物(诸如例如狗、猫)、实验室动物(诸如例如小鼠、大鼠、兔)和非人灵长类动物(诸如例如猿和猴)。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者是在医生护理下的患者。在一些实施方案中,受试者是吸烟者。在一些实施方案中,受试者是烟草产品的吸烟者。

[0026] 根据本公开,已经鉴定了ITGA1基因中与降低的发展成人肺病的风险相关的罕见变体。根据本公开进一步观察到,ITGA1功能丧失变体核酸分子(无论这些变异在特定受试者中是纯合的还是杂合的)的负荷与降低的发展成肺病的风险相关。此外,本公开对额外变体与基因负荷屏蔽之间的关联的鉴定指示ITGA1本身(而不是与另一基因中的变体连锁不平衡)负责肺病中的保护作用。据信ITGA1基因或蛋白质的变体不具有任何已知的与肺病(诸如肺纤维化、间质性肺病、慢性阻塞性肺病或哮喘)的相关性。总之,本文所述的遗传分析令人惊讶地指示,ITGA1基因并且特别是ITGA1基因中的功能丧失变体与降低的发展成纤维化肺病的风险有关。因此,可以治疗作为具有增加的发展成纤维性肺病的风险的ITGA1参考的受试者,使得预防纤维性肺病、减轻其症状和/或抑制症状的发展。因此,本公开提供了利用对受试者中此类变体的鉴定来对来对此类受试者中发展成纤维化肺病的风险进行鉴定或分层的方法,或将受试者诊断为具有增加的发展成纤维化肺病的风险的方法,从而可以相应地治疗处于风险中的受试者或患有活动性疾病的受试者。

[0027] 为了本公开的目的,可以将任何特定的人分类为具有三种ITGA1基因型中的一者: i) ITGA1参考; ii) 对于ITGA1变体核酸分子是杂合的; 或 iii) 对于ITGA1变体核酸分子是纯合的。当人没有ITGA1变体核酸分子的拷贝时,人是ITGA1参考。当人具有ITGA1变体核酸分子的单个拷贝时,人对于ITGA1变体核酸分子是杂合的。当人具有ITGA1变体核酸分子的两个拷贝时,人对于ITGA1变体核酸分子是纯合的。具有部分功能丧失(或预测的部分功能丧失)的ITGA1多肽的人对于ITGA1是亚效的(hypomorphic)。

[0028] 如本文所用,ITGA1变体核酸分子是编码具有部分功能丧失、完全功能丧失、预测

的部分功能丧失或预测的完全功能丧失的ITGA1多肽的任何ITGA1核酸分子(诸如基因组核酸分子、mRNA分子或cDNA分子)。ITGA1变体核酸分子也可以是错义变体、剪接位点变体、终止-增益变体、起始-丢失变体、终止-丢失变体、移码变体或框内插入缺失变体或编码截短的ITGA1预测的功能丧失性多肽的变体。ITGA1变体核酸分子也可以是导致ITGA1 mRNA或多肽完全丧失或降低或异常表达的任何核酸分子(诸如基因组核酸分子、mRNA分子或cDNA分子)。ITGA1变体核酸分子也可以是导致ITGA1活性降低的任何错义变体核酸分子(诸如基因组核酸分子、mRNA分子或cDNA分子)。

[0029] ITGA1变体核酸分子(诸如ITGA1功能丧失变体核酸分子)的合适实例包括以下变异(染色体:位置(GRCh38.p13):参考等位基因:交替的等位基因):5:52920430:C:T、5:52944942:G:T、5:52910243:G:T、5:52918899:G:C、5:52918730:A:T、5:52952404:CA:C、5:52861561:T:C、5:52939693:T:C、5:52910201:C:T、5:52788416:T:C、5:52788356:G:A、5:52893783:G:T、5:52920332:AT:A、5:52952436:GA:G、5:52939945:G:T、

[0030] 5:52925371:C:T、5:52939690:TG:T、5:52898385:T:C、5:52897529:GT:G、5:52937490:C:G、

[0031] 5:52947412:CT:C、5:52882022:G:T、5:52939946:T:A、5:52861503:A:AT、5:52881929:T:G、

[0032] 5:52932134:C:A、5:52939933:AC:A、5:52933993:C:G、5:52927645:TCCTG:T、5:52939934:CT:C、5:52893841:G:C、5:52881939:G:T、5:52932134:C:G、5:52864814:GA:G、5:52849381:C:A、5:52922818:C T:C、5:52925286:TG:T、5:52865083:G:A、5:52939606:C:CAT、5:52915509:C:CGTGGTGA、5:52865083:G:T、5:52944999:ATC:A、5:52910194:TA:T、5:52947462:G:A、5:52898323:C:T、5:52945006:GT:G、5:52910292:CT:C、5:52861560:G:A、5:52939642:G:GA、5:52864979:G C:G、5:52927590:CA:C、5:52918814:G:T、5:52788351:G:GC、5:52920469:G:A、5:52905808:A:AT、5:52922876:GT:G、5:52861501:C:CT、5:52865771:T:A、5:52947456:TGG:T、5:52918736:C:T、5:52920376:C:T、5:52915496:G:GA、5:52898346:GTC:G、5:52947462:G:T、5:52920444:C:A、5:52882022:G:A、5:52927640:TC:T、5:52925470:G:GT、5:52952430:GA:G、5:52937516:T:C、5:52915570:G:GC、5:52861530:C:A、5:52932046:G:A、5:52893841:G:T、5:52887965:TGTAA:T、5:52937399:AG:A、5:52887863:AG:A、5:52905910:T:A、5:52925304:TA:T、5:52910222:C:T、5:52887906:C:T、5:52910199:AG:A、5:52909042:G:A、5:52898269:TA:T、5:52939588:A:C、5:52937515:G:GT、5:52865745:C:A、5:52937474:GT:G、5:52925299:G:T、5:52920367:CA:C、5:52898296:CAG:C、5:52925283:CT:C、5:52893817:GAGAA:G、5:52915565:TG:T、5:52933892:A:T、5:52915524:G:T、5:52887846:C:T、5:52937515:G:A、5:52929670:GA:G、5:52915463:G:A、5:52905900:G:T、5:52865688:AG:A、5:52933993:C:A、5:52932137:G:A、5:52788355:T:C、5:52897529:G:A、5:52947344:G:A、5:52910417:CAAGT:C、5:52864772:C:A、5:52939677:C:T、5:52918807:C:A、5:52915502:TTTT GG:T、5:52893693:C:T、5:52939855:A:T、5:52925489:T:C、5:52939673:C:CA、5:52887966:G:T、5:52918877:GA:G和5:52947463:T:C。一种或多种交替的等位基因是一种或多种变体核苷酸。位置是变体位置。

[0033] 对于经基因型分型或确定为ITGA1参考的受试者,此类受试者具有增加的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险。对于经基因分型或确定为ITGA1参

考或对于ITGA1变体核酸分子是杂合的受试者,此类受试者可以用ITGA1抑制剂治疗。

[0034] 在本公开通篇描述的任何实施方案中,肺病是纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘。在本公开通篇描述的任何实施方案中,肺病是纤维化肺病。在本公开通篇描述的任何实施方案中,肺病是肺纤维化。在本公开通篇描述的任何实施方案中,肺病是间质性肺病。在本公开通篇描述的任何实施方案中,肺病是慢性阻塞性肺病。在本公开通篇描述的任何实施方案中,肺病是哮喘。

[0035] 肺病(诸如纤维化肺病)的症状包括但不限于气短(呼吸困难)、干咳、疲劳、不明原因的体重减轻、肌肉和关节疼痛以及手指或脚趾尖变宽变圆(杵状指)。

[0036] 本公开提供了治疗患有纤维化肺病或处于发展成纤维化肺病的风险下的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用ITGA1抑制剂。

[0037] 本公开还提供了治疗患有肺纤维化或处于发展成肺纤维化的风险下的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用ITGA1抑制剂。

[0038] 本公开还提供了治疗患有间质性肺病或处于发展成间质性肺病的风险下的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用ITGA1抑制剂。

[0039] 本公开还提供了治疗患有COPD或处于发展成COPD的风险下的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用ITGA1抑制剂。

[0040] 本公开还提供了治疗患有哮喘或处于发展成哮喘的风险下的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用ITGA1抑制剂。

[0041] 在一些实施方案中,ITGA1抑制剂包含抑制性核酸分子。在一些实施方案中,抑制性核酸分子包含反义分子、小干扰RNA(siRNA)分子或短发夹RNA(shRNA)分子。在一些实施方案中,抑制性核酸分子包含反义分子。在一些实施方案中,抑制性核酸分子包含siRNA分子。在一些实施方案中,抑制性核酸分子包含shRNA分子。此类抑制性核酸分子可以设计成靶向ITGA1核酸分子(诸如mRNA分子)的任何区域。在一些实施方案中,抑制性核酸分子与ITGA1基因组核酸分子或mRNA分子内的序列杂交并降低受试者细胞中ITGA1多肽的表达。在一些实施方案中,ITGA1抑制剂包括与ITGA1基因组核酸分子或mRNA分子杂交并且降低受试者细胞中的ITGA1多肽的表达的反义分子。在一些实施方案中,ITGA1抑制剂包括与ITGA1基因组核酸分子或mRNA分子杂交并且降低受试者细胞中的ITGA1多肽的表达的siRNA。在一些实施方案中,ITGA1抑制剂包括与ITGA1基因组核酸分子或mRNA分子杂交并且降低受试者细胞中的ITGA1多肽的表达的shRNA。

[0042] 在一些实施方案中,反义核酸分子包含由SEQ ID NO:32-18299所示的核苷酸序列中的任一者或由其组成。在一些实施方案中,siRNA分子包含由SEQ ID NO:18300-69677所示的核苷酸序列(有义链和反义链相继呈现)中的任一者或由其组成(例如,有义链是例如SEQ ID NO:18300,并且对应的反义链是SEQ ID NO:18301;有义链是例如SEQ ID NO:18302,并且对应的反义链是SEQ ID NO:18303;等)。

[0043] 抑制性核酸分子可包括RNA、DNA,或RNA和DNA两者。抑制性核酸分子还可与异源核酸序列(诸如载体中的异源核酸序列)或异源标记连接或融合。例如,抑制性核酸分子可在包含抑制性核酸分子和异源核酸序列的载体内或作为包含抑制性核酸分子和异源核酸序列的外源供体序列。抑制性核酸分子还可与异源标记连接或融合。标记可以是直接可检测的(诸如例如荧光团)或间接可检测的(诸如例如半抗原、酶或荧光团淬灭剂)。此类标记可

通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学或化学手段检测。此类标记包括例如放射性标记、颜料、染料、色原、自旋标记和荧光标记。标记也可以是例如化学发光物质；含金属物质；或酶，其中发生依赖于酶的二次信号产生。术语“标记”还可指“标签”或半抗原，其可选择性地与缀合分子结合，使得缀合分子在随后与底物一起添加时用于产生可检测信号。例如，生物素可与辣根过氧化物酶 (HRP) 的亲合素或链霉亲和素缀合物一起用作标签以与标签结合，并使用量热底物 (诸如例如四甲基联苯胺 (TMB)) 或荧光底物进行检查以检测 HRP 的存在。可用作标签来促进纯化的示例性标记包括但不限于 myc、HA、FLAG 或 3XFLAG、6XHis 或聚组氨酸、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)、麦芽糖结合蛋白、表位标签或免疫球蛋白的 Fc 部分。许多标记包括例如颗粒、荧光团、半抗原、酶及其量热、荧光和化学发光底物和其他标记。

[0044] 抑制性核酸分子可包括例如核苷酸或非天然或修饰的核苷酸，诸如核苷酸类似物或核苷酸替代物。此类核苷酸包括含有修饰的碱基、糖或磷酸基团的核苷酸，或者在其结构中掺入有非天然部分的核苷酸。非天然核苷酸的实例包括但不限于双脱氧核苷酸、生物素化的、胺化的、脱氨基的、烷基化的、苄基化的和荧光团标记的核苷酸。

[0045] 抑制性核酸分子还可包含一种或多种核苷酸类似物或取代。核苷酸类似物是含有对碱基、糖或磷酸部分的修饰的核苷酸。对碱基部分的修饰包括但不限于 A、C、G 和 T/U 以及不同的嘌呤或嘧啶碱基 (诸如例如假尿苷、尿嘧啶-5-基、次黄嘌呤-9-基 (I) 和 2-氨基腺嘌呤-9-基) 的天然和合成修饰。修饰的碱基包括但不限于 5-甲基胞嘧啶

[0046] (5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的 6-甲基和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的 2-丙基和其他烷基衍生物、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和 2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、

[0047] 5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶 (假尿嘧啶)、

[0048] 4-硫代尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫代、8-硫代烷基、8-羟基和其他 8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代 (诸如例如 5-溴)、5-三氟甲基和其他 5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤、8-氮杂腺嘌呤、

[0049] 7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤和 3-脱氮腺嘌呤。

[0050] 核苷酸类似物还可包括对糖部分的修饰。对糖部分的修饰包括但不限于核糖和脱氧核糖的天然修饰以及合成修饰。糖修饰包括但不限于在 2' 位置处的以下修饰：OH；F；O-、S-或 N-烷基；O-、S-或 N-烯基；

[0051] O-、S-或 N-炔基；或 O-烷基-O-烷基，其中烷基、烯基和炔基可以是取代或未取代的 C₁₋₁₀ 烷基或 C₂₋₁₀ 烯基和 C₂₋₁₀ 炔基。示例性的 2' 糖修饰还包括但不限于 -O[(CH₂)_nO]_mCH₃、-O(CH₂)_nOCH₃、-O(CH₂)_nNH₂、-O(CH₂)_nCH₃、-O(CH₂)_n-ONH₂ 和 -O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂，其中 n 和 m 独立地为 1 至约 10。2' 位置处的其他修饰包括但不限于 C₁₋₁₀ 烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或 O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA 切割基团、报告基团、嵌入剂、用于改善寡核苷酸的药代动力学特性的基团或用于改善寡核苷酸的药效动力学特性的基团，以及具有类似特性的其他取代基。还可在糖上的其他位置上做出类似的修饰，具体地在 3' 末端核苷酸上或在 2'-5' 连接的寡核苷酸中的糖的 3' 位置和 5' 末端核苷酸的 5' 位置。修饰的糖还可包括在桥环氧处含有修饰 (诸如 CH₂ 和 S) 的那些糖。核苷酸

糖类似物还可具有替代呋喃戊糖的糖模拟物诸如环丁基部分。

[0052] 核苷酸类似物还可在磷酸酯部分处进行修饰。修饰的磷酸酯部分包括但不限于可被修饰以使得两个核苷酸之间的键联含有以下的修饰的磷酸酯部分：硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基磷酸酯(包括3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯)、次磷酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫羰氨基磷酸酯、硫羰烷基磷酸酯、硫羰烷基磷酸三酯和硼烷磷酸酯。两个核苷酸之间的这些磷酸酯或修饰的磷酸酯键联可通过3'-5'键联或2'-5'键联,并且所述键联可包含反转的极性,诸如3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'。还包括各种盐、混合盐以及游离酸形式。核苷酸替代物还包括肽核酸(PNA)。

[0053] 在一些实施方案中,反义核酸分子是间隔体(gapmer),由此在5'和3'端的前一个至七个核苷酸各自具有2'-甲氧基乙基(2'-MOE)修饰。在一些实施方案中,5'和3'端的前五个核苷酸各自具有2'-MOE修饰。在一些实施方案中,5'和3'端的前一个至七个核苷酸是RNA核苷酸。在一些实施方案中,5'和3'端的前五个核苷酸是RNA核苷酸。在一些实施方案中,核苷酸之间的每个骨架键联是硫代磷酸酯键联。

[0054] 在一些实施方案中,siRNA分子具有末端修饰。在一些实施方案中,反义链的5'端被磷酸化。在一些实施方案中,使用不能水解的5'-磷酸酯类似物,诸如5'-(E)-乙烯基磷酸酯。

[0055] 在一些实施方案中,siRNA分子具有主链修饰。在一些实施方案中,已证明连接连续核糖核苷的修饰的磷酸二酯基团会增强siRNA的稳定性和体内生物利用率。磷酸二酯键联的非酯类基团(-OH、=O)可被硫、硼或乙酸酯替换,得到硫代磷酸酯、硼酸磷酸酯和磷酰基乙酸酯键联。另外,用磷酸三酯取代磷酸二酯基团可促进siRNA的细胞摄取并通过消除它们的负电荷而保留在血清组分上。在一些实施方案中,siRNA分子具有糖修饰。在一些实施方案中,糖被去质子化(由外切和内切核酸酶催化的反应),由此

[0056] 2'-羟基可充当亲核试剂并攻击磷酸二酯键中相邻的磷。此类替代方案包括2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基和2'-氟修饰。

[0057] 在一些实施方案中,siRNA分子具有碱基修饰。在一些实施方案中,碱基可被修饰的碱基,诸如假尿苷、5'-甲基胞苷、N6-甲基腺苷、肌苷和N7-甲基鸟苷取代。

[0058] 在一些实施方案中,siRNA分子与脂质缀合。脂质可缀合到siRNA的5'或3'末端,以通过允许它们与血清脂蛋白缔合来提高它们的体内生物利用率。代表性的脂质包括但不限于胆固醇和维生素E,以及脂肪酸,诸如棕榈酸酯和生育酚。

[0059] 在一些实施方案中,代表性siRNA具有下式:

[0060] 有义:mN*mN*/i2FN/mN/i2FN/mN/i2FN/mN/i2FN/mN/i2FN/mN/i2FN/mN/

[0061] i2FN/*mN*/32FN/

[0062] 反义:/52FN/*/i2FN/*mN/i2FN/mN/i2FN/mN/i2FN/mN/i2FN/mN/i2FN/mN/i2FN/mN/

[0063] i2FN/mN/i2FN/mN*N*N

[0064] 其中:“N”是碱基;“2F”是2'-F修饰;“m”是2'-O-甲基修饰,“I”是内部碱基;并且“*”是硫代磷酸酯骨架键联。

[0065] 在本文描述的任何实施方案中,抑制性核酸分子可以例如作为一至两小时静脉内

输注剂或皮下注射剂施用。在本文所述的任何实施方案中,抑制性核酸分子可以范围为约50mg至约900mg、约100mg至约800mg、约150mg至约700mg或约175mg至约640mg(2.5mg/kg至9.14mg/kg;92.5至338mg/m²-基于体重为70kg的假设以及根据对于人为37的mg/kg剂量乘数值(dose multiplier value)对mg/kg剂量水平向mg/m²剂量水平的转换)的剂量水平施用。

[0066] 本公开还提供了包含该抑制性核酸分子中的任一种或多种抑制性核酸分子的载体。在一些实施方案中,载体包含抑制性核酸分子中的任一种或多种和异源核酸。载体可以是能够转运核酸分子的病毒或非病毒载体。在一些实施方案中,载体是质粒或粘粒(诸如例如可将额外的DNA区段连接到其中的环状双链DNA)。在一些实施方案中,载体是病毒载体,其中额外的DNA区段可连接到病毒基因组中。表达载体包括但不限于质粒、粘粒、逆转录病毒、腺病毒、腺关联病毒(AAV)、植物病毒(诸如花椰菜嵌纹病毒和烟草嵌纹病毒)、酵母人工染色体(YAC)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)来源的附加体以及本领域已知的其他表达载体。

[0067] 本公开还提供了包含抑制性核酸分子中的任一种或多种的组合物。在一些实施方案中,组合物是药物组合物。在一些实施方案中,组合物包含载剂和/或赋形剂。载剂的实例包括但不限于聚(乳酸)(PLA)微球、聚(D,L-乳酸-共乙醇酸)(PLGA)微球、脂质体、胶束、反胶束、脂质螺旋物和脂质微管。载剂可包括缓冲盐溶液,诸如PBS、HBSS等。

[0068] 在一些实施方案中,ITGA1抑制剂包括在一个或多个识别序列处诱导一个或多个切口或双链断裂的核酸酶剂或者结合至ITGA1基因组核酸分子内的识别序列的DNA结合蛋白。识别序列可以位于ITGA1基因的编码区内,或影响基因表达的调节区内。DNA结合蛋白或核酸酶剂的识别序列可位于内含子、外显子、启动子、增强子、调控区或任何非蛋白质编码区中。识别序列可包括或接近ITGA1基因的起始密码子。例如,识别序列可位于距起始密码子约10个、约20个、约30个、约40个、约50个、约100个、约200个、约300个、约400个、约500个或约1,000个核苷酸处。作为另一实例,可使用两种或更多种核酸酶剂,每种核酸酶剂均靶向包括或接近起始密码子的核酸酶识别序列。作为另一实例,可使用两种核酸酶剂,一种靶向包括或接近起始密码子的核酸酶识别序列,并且一种靶向包括或接近终止密码子的核酸酶识别序列,其中核酸酶剂的切割可导致两个核酸酶识别序列之间的编码区的缺失。将切口或双链断裂诱导到所需识别序列中的任何核酸酶剂均可用于本文公开的方法和组合物中。结合所需识别序列的任何DNA结合蛋白均可用于本文公开的方法和组合物中。

[0069] 用于本文的合适的核酸酶剂和DNA结合蛋白包括但不限于锌指蛋白或锌指核酸酶(ZFN)对、转录激活因子样效应物(TALE)蛋白或转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN),或成簇规则散布的短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR相关(Cas)系统。识别序列的长度可变化,并且包括例如对于锌指蛋白或ZFN对为约30-36bp、对于每个ZFN为约15-18bp、对于TALE蛋白或TALEN为约36bp且对于CRISPR/Cas指导RNA为约20bp的识别序列。

[0070] 在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统可用于修饰细胞内的ITGA1基因组核酸分子。本文公开的方法和组合物可以通过利用CRISPR复合物(包含与Cas蛋白复合的指导RNA(gRNA))对ITGA1核酸分子进行定点切割来使用CRISPR-Cas系统分子。

[0071] Cas蛋白通常包含至少一个可与gRNA相互作用的RNA识别或结合结构域。Cas蛋白还可包含核酸酶结构域(诸如例如DNA酶或RNA酶结构域)、DNA结合结构域、解旋酶结构域、蛋白质-蛋白质相互作用结构域、二聚化结构域和其他结构域。合适的Cas蛋白包括例如野

生型Cas9蛋白和野生型Cpf1蛋白(诸如例如FnCpf1)。Cas蛋白可以具有完全切割活性以在ITGA1基因组核酸分子中产生双链断裂,或者它可以是在ITGA1基因组核酸分子中产生单链断裂的切口酶。Cas蛋白的额外实例包括但不限于Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e(CasD)、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9(Csn1或Csx12)、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1(CasA)、Cse2(CasB)、Cse3(CasE)、Cse4(CasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4和Cu1966以及其同系物或修饰形式。在一些实施方案中,Cas系统(诸如Cas12a)可具有编码为单个crRNA的多个gRNA。Cas蛋白也可作为融合蛋白与异源多肽可操作地连接。例如,Cas蛋白可与切割结构域、表观遗传修饰结构域、转录激活结构域或转录抑制结构域融合。Cas蛋白可以任何形式提供。例如,Cas蛋白可以蛋白,诸如与gRNA复合的Cas蛋白的形式提供。替代地,Cas蛋白可编码Cas蛋白的核酸分子,诸如RNA或DNA的形式提供。

[0072] 在一些实施方案中,可通过使细胞与Cas蛋白和一种或多种gRNA接触来产生ITGA1基因组核酸分子的靶向遗传修饰,所述gRNA与在ITGA1基因组核酸分子中的靶基因组基因座内的一种或多种gRNA识别序列杂交。例如,gRNA识别序列可位于SEQ ID NO:1的区域内。gRNA识别序列还可包括或接近对应于变体位置的位置。例如,gRNA识别序列可位于距变体位置约1000个、约500个、约400个、约300个、约200个、约100个、约50个、约45个、约40个、约35个、约30个、约25个、约20个、约15个、约10个或约5个核苷酸处。gRNA识别序列可包括或接近ITGA1基因组核酸分子的起始密码子或ITGA1基因组核酸分子的终止密码子。例如,gRNA识别序列可位于距起始密码子或终止密码子约10个、约20个、约30个、约40个、约50个、约100个、约200个、约300个、约400个、约500个或约1,000个核苷酸处。

[0073] ITGA1基因组核酸分子中靶基因组基因座内的gRNA识别序列位于原间隔序列邻近基序(PAM)序列附近,该PAM序列是紧随Cas9核酸酶靶向的DNA序列之后的2-6个碱基对的DNA序列。典型的PAM是序列5'-NGG-3',其中“N”是后接两个鸟嘌呤(“G”)核碱基的任何核碱基。gRNA可将Cas9转运至基因组中的任何位置用于基因编辑,但在除了Cas9识别PAM的位点之外的任何位点都不会发生编辑。另外,5'-NGA-3'可作为人体细胞的高效非典型PAM。一般而言,PAM在gRNA靶向的DNA序列下游约2个至约6个核苷酸处。PAM可侧接gRNA识别序列。在一些实施方案中,gRNA识别序列可在3'端被PAM侧接。在一些实施方案中,gRNA识别序列可在5'端被PAM侧接。例如,Cas蛋白的切割位点可在PAM序列上游或下游约1个至约10个碱基对、约2个至约5个碱基对、或3个碱基对处。在一些实施方案中(诸如当使用来自酿脓链球菌(*S. pyogenes*)的Cas9或密切相关的Cas9时),非互补链的PAM序列可以是5'-NGG-3',其中N是任何DNA核苷酸并且紧邻靶DNA的非互补链的gRNA识别序列的3'。因而,互补链的PAM序列将是5'-CCN-3',其中N是任何DNA核苷酸并紧邻靶DNA的互补链的gRNA识别序列的5'。

[0074] gRNA是与Cas蛋白结合并将Cas蛋白靶向ITGA1基因组核酸分子内的特定位置的RNA分子。示例性gRNA是有效引导Cas酶结合到或切割ITGA1基因组核酸分子的gRNA其中所述gRNA包含DNA靶向区段,所述DNA靶向区段与包括或接近对应于变体位置的位置的ITGA1基因组核酸分子内的gRNA识别序列杂交。例如,可以选择gRNA,使得其与位于距变体位置约5个、约10个、约15个、约20个、约25个、约30个、约35个、约40个、约45个、约50个、约100个、约

200个、约300个、约400个、约500个或约1,000个核苷酸处的gRNA识别序列杂交。其他示例性gRNA包含与包括或接近起始密码子或终止密码子的ITGA1基因组核酸分子内存在的gRNA识别序列杂交的DNA靶向区段。例如,可选择gRNA,使得其与位于距起始密码子约5个、约10个、约15个、约20个、约25个、约30个、约35个、约40个、约45个、约50个、约100个、约200个、约300个、约400个、约500个或约1,000个核苷酸处或位于距终止密码子约5个、约10个、约15个、约20个、约25个、约30个、约35个、约40个、约45个、约50个、约100个、约200个、约300个、约400个、约500个或约1,000个核苷酸处的gRNA识别序列杂交。合适的gRNA可包含约17个至约25个核苷酸、约17个至约23个核苷酸、约18个至约22个核苷酸或约19个至约21个核苷酸。在一些实施方案中,gRNA可包含20个核苷酸。

[0075] 位于ITGA1参考基因内的合适的gRNA识别序列的实例在表1中作为SEQ ID NO:12-31示出。

[0076] 表1:一种或多种ITGA1变异附近的指导RNA识别序列

链	gRNA 识别序列	SEQ ID NO:
-	TGGCCTGTATGATTGTACCG	12
-	TGCAACAAGTACCTCTTCGG	13
+	ACAGCGTATTCCATCAGGTG	14
+	CACAGCGTATTCCATCAGGT	15
+	TAAGTATTCTTCCACCGAAG	16
+	ATTCTTGGCAGCTATAACCG	17
+	TGTGTAAAGTTGGATCTACC	18
-	GGTAGATCCAACCTTACACA	19
+	GAAAACAAAAATGAGCCATG	20
+	TTCCAACAGTATTTACCCAT	21
+	AACAACAACCTGACATTGACA	22
+	TAAGCACTCCTTCTACATGT	23
+	TCGGTACAATCATACAGGCC	24
-	TTAGTGAATCTAGGGTGACA	25
+	GAGGCATTCACGGAAGCCCG	26
-	AATTCACGACTTGAAATGTG	27
+	AAGAAAACTGCCATATGGA	28
-	TAAAATCTGTACCTTGTACA	29
+	GAGCAGTAGGAGCCTATGAT	30
+	GTTTGAATATCAAATGAGCC	31

[0078] Cas蛋白和gRNA形成复合物,并且Cas蛋白切割靶ITGA1基因组核酸分子。Cas蛋白可在gRNA的DNA靶向区段将与之结合的靶ITGA1基因组核酸分子中存在的核酸序列内或外的位点处切割核酸分子。例如,CRISPR复合物(包含与gRNA识别序列杂交并与Cas蛋白复合的gRNA)的形成可导致在gRNA的DNA靶向区段将与之结合的ITGA1基因组核酸分子中存在的核酸序列中或附近(诸如例如距所述核酸序列1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50个或更多个碱基对以内)一条或两条链的切割。

[0079] 此类方法可产生例如其中SEQ ID NO:1的区域被破坏,起始密码子被破坏,终止密码子被破坏或编码序列被破坏或缺失的ITGA1基因组核酸分子。任选地,细胞可以进一步与

一种或多种额外的gRNA接触,所述额外的gRNA与ITGA1基因组核酸分子中靶基因组基因座内另外的gRNA识别序列杂交。通过使细胞与一种或多种另外的gRNA(诸如例如与第二gRNA识别序列杂交的第二gRNA)接触,由Cas蛋白切割可产生两个或更多个双链断裂或者两个或更多个单链断裂。

[0080] 在一些实施方案中,ITGA1抑制剂包括小分子。在一些实施方案中,ITGA1抑制剂是奥布他汀(obtustatin)。

[0081] 在一些实施方案中,治疗方法还包括检测来自受试者的生物样品中ITGA1变体核酸的存在或不存在。

[0082] 本公开还提供了用肺病治疗剂治疗受试者的方法。在一些实施方案中,受试者患有肺病。在一些实施方案中,受试者具有增加的发展成肺病的风险。在一些实施方案中,所述方法包括通过以下方式确定受试者是否具有ITGA1变体核酸分子:从受试者获得或已经获得生物样品,并且对生物样品进行或已经进行序列分析以确定受试者是否具有包含ITGA1变体核酸分子的基因型。当受试者是ITGA1参考时,向受试者施用或继续施用标准剂量的肺病治疗剂,并且向受试者施用ITGA1抑制剂。当受试者对于ITGA1变体核酸分子是杂合的时,向受试者施用或继续施用与标准剂量相同或低于标准剂量的量的肺病治疗剂,并且向受试者施用ITGA1抑制剂。具有ITGA1变体核酸分子的基因型的存在指示受试者具有降低的发展成肺病的风险。在一些实施方案中,受试者是ITGA1参考。在一些实施方案中,受试者对于ITGA1变体核酸分子是杂合的。

[0083] 对于经基因分型或确定为ITGA1参考或对于ITGA1变体核酸分子是杂合的受试者,此类受试者可以用如本文所述的ITGA1抑制剂治疗。

[0084] 检测来自受试者的生物样品中ITGA1变体核酸分子的存在或不存在和/或确定受试者是否具有ITGA1变体核酸分子可通过本文所述的任何方法进行。在一些实施方案中,这些方法可在体外进行。在一些实施方案中,这些方法可原位进行。在一些实施方案中,这些方法可在体内进行。在这些实施方案中的任一项中,ITGA1变体核酸分子可存在于从受试者获得的细胞内。

[0085] 在一些实施方案中,当受试者是ITGA1参考时,还向受试者施用标准剂量的肺病治疗剂。在一些实施方案中,当受试者对于ITGA1变体核酸分子是杂合的时,还向受试者施用与标准剂量相同或低于标准剂量的剂量的肺病治疗剂。

[0086] 在一些实施方案中,治疗方法还包括检测来自受试者的生物样品中ITGA1预测的功能丧失性多肽的存在或不存在。在一些实施方案中,当受试者不具有ITGA1预测的功能丧失性多肽时,还向受试者施用标准剂量的肺病治疗剂。在一些实施方案中,当受试者具有ITGA1预测的功能丧失性多肽时,还向受试者施用与标准剂量相同或低于标准剂量的剂量的肺病治疗剂。

[0087] 本公开还提供了用肺病治疗剂治疗受试者的方法。在一些实施方案中,受试者患有肺病。在一些实施方案中,受试者具有增加的发展成肺病的风险。在一些实施方案中,所述方法包括通过以下方式确定受试者是否具有ITGA1预测的功能丧失性多肽:从受试者获得或已经获得生物样品,并且对生物样品进行或已经进行测定以确定受试者是否具有ITGA1预测的功能丧失性多肽。当受试者不具有ITGA1预测的功能丧失性多肽时,向受试者施用或继续施用标准剂量的肺病治疗剂,并且向受试者施用ITGA1抑制剂。当受试者具有

ITGA1预测的功能丧失性多肽时,向受试者施用或继续施用与标准剂量量相同或低于标准剂量量的量的肺病治疗剂,并且向受试者施用ITGA1抑制剂。ITGA1预测的功能丧失性多肽的存在指示受试者具有降低的发展成肺病的风险。在一些实施方案中,受试者具有ITGA1预测的功能丧失性多肽。在一些实施方案中,受试者不具有ITGA1预测的功能丧失性多肽。

[0088] 检测来自受试者的生物样品中ITGA1预测的功能丧失性多肽的存在或不存在和/或确定受试者是否具有ITGA1预测的功能丧失性多肽可通过本文所述的任何方法进行。在一些实施方案中,这些方法可在体外进行。在一些实施方案中,这些方法可原位进行。在一些实施方案中,这些方法可在体内进行。在任何这些实施方案中,ITGA1预测的功能丧失性多肽可存在于从受试者获得的细胞内。

[0089] 肺病治疗剂的实例包括但不限于尼达尼布(nintedanib)、吡非尼酮(pirfenidone)、强的松(prednisone)、硫唑嘌呤(azathioprine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、吗替麦考酚酯(mycophenolate mofetil)、利妥昔单抗(rituximab)、他克莫司(tacrolimus)、复方新诺明(cotrimoxazole)、来瑞组单抗(lebrikizumab)、癸酸南诺龙(nandrolone decanoate)、西罗莫司(sirolimus)、沙利度胺(thalidomide)和泊马度胺(pomalidomide)。

[0090] 在一些实施方案中,与作为ITGA1参考的受试者(其可以接受标准剂量)相比,对于ITGA1变体核酸分子是杂合的受试者(即,低于标准剂量),肺病治疗剂的剂量可以减少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%或约90%。在一些实施方案中,肺病治疗剂的剂量可以减少约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。另外,与作为ITGA1参考的受试者相比,在对于ITGA1变体核酸分子是杂合的受试者中肺病治疗剂的剂量可以以较低频率施用。

[0091] 肺病治疗剂和/或ITGA1抑制剂的施用可以在一天、两天、三天、五天、一周、两周、三周、一个月、五周、六周、七周、八周、两个月或三个月后重复。重复施用可按相同的剂量或按不同的剂量。施用可重复一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次或更多次。例如,根据某些剂量方案,受试者可接受较长时间段的治疗,诸如例如6个月、1年或更长时间。此外,肺病治疗剂和/或ITGA1抑制剂可以依次或同时施用。此外,肺病治疗剂和/或ITGA1抑制剂可以在单独的组合物中施用,或可以在同一组合物中一起施用。

[0092] 肺病治疗剂和/或ITGA1抑制剂的施用可通过任何合适的途径进行,包括但不限于肠胃外、静脉内、口服、皮下、动脉内、颅内、鞘内、腹膜内、局部、鼻内或肌内。用于施用的药物组合物理想地是无菌且基本上等渗的,并且在GMP条件下制造。药物组合物可以单位剂型(即单次施用的剂量)提供。药物组合物可使用一种或多种生理上和药学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂或助剂来配制。制剂取决于所选的施用途径。术语“药学上可接受的”意指载剂、稀释剂、赋形剂或助剂与制剂的其他成分相容,并且对其接受者基本上无害。

[0093] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”以及“预防(prevent)”、“预防(preventing)”和“预防(prevention)”分别是指引发期望的生物反应,诸如治疗效果和预防效果。在一些实施方案中,治疗作用包括以下中的一者或多者:在施用药剂或包含药剂的组合物之后,肺病的减少/减轻、肺病严重度的减少/减轻(诸如例如肺病发展的减少或抑制)、症状和肺病相关的影响的减少/减轻、延迟症状的发作和肺病相关的影响、减轻症状的严重度和肺病相关的影响、减轻急性发作的严重度、减少症状的数

量和肺病相关的影响、减少症状的潜伏期和肺病相关的影响、症状和肺病相关的影响的改善、减轻继发症状、减轻继发感染、预防肺病的复发、减少复发的次数或频率、增加症状发作之间的潜伏期、增加持续进展的时间、加速缓解、诱导缓解、增加缓解、加速恢复、或者增加替代疗法的功效或减少对替代疗法的耐受性、和/或增加受影响的宿主动物的存活时间。预防作用可以包括在治疗方案施用之后,肺病发展/进展的完全或部分避免/抑制或延迟(诸如例如完全或部分避免/抑制或延迟)、和增加受影响的宿主动物的存活时间。肺病的治疗涵盖治疗已经被诊断为患有处于任何临床阶段或表现的任何形式的肺病的受试者,延迟肺病的症状或体征的发作或演变或加重或恶化,和/或预防和/或减轻肺病的严重程度。

[0094] 本公开还提供了鉴定具有增加的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险的受试者的方法。在一些实施方案中,所述方法包括确定或已经确定从受试者获得的生物样品中ITGA1变体核酸分子(诸如基因组核酸分子、mRNA分子和/或cDNA分子)的存在或不存在。当受试者缺乏ITGA1变体核酸分子时(即,受试者在基因型上被归类为ITGA1参考),则受试者具有增加的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险。当受试者具有ITGA1变体核酸分子时(即,受试者对于ITGA1变体核酸分子是杂合的或纯合的),则与作为ITGA1参考的受试者相比,受试者具有降低的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险。

[0095] 具有ITGA1变体核酸分子的单个拷贝比不具有ITGA1变体核酸分子的拷贝更能保护受试者免于发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘。不期望受限于任何特定的理论或作用机制,据信ITGA1变体核酸分子的单个拷贝(即,对于ITGA1变体核酸分子是杂合的)保护受试者免于发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘,并且还据信具有ITGA1变体核酸分子的两个拷贝(即,对于ITGA1变体核酸分子是纯合的)相对于具有单个拷贝的受试者可更能保护受试者免于发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘。因此,在一些实施方案中,ITGA1变体核酸分子的单个拷贝可能不具完全保护性,而是可能部分或不完全地保护受试者免于发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘。虽然不希望受任何特定理论束缚,但可能存在涉及纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的发展的其他因子或分子,其仍存在于具有ITGA1变体核酸分子的单个拷贝的受试者中,因此导致对纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的发展的保护不太完全。

[0096] 检测来自受试者的生物样品中ITGA1变体核酸分子的存在或不存在和/或确定受试者是否具有ITGA1变体核酸分子可通过本文所述的任何方法进行。在一些实施方案中,这些方法可在体外进行。在一些实施方案中,这些方法可原位进行。在一些实施方案中,这些方法可在体内进行。在这些实施方案中的任一项中,ITGA1变体核酸分子可存在于从受试者获得的细胞内。

[0097] 在一些实施方案中,当受试者被鉴定为具有增加的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险时,用如本文所述的肺病治疗剂和/或ITGA1抑制剂进一步治疗受试者。例如,当所述受试者是ITGA1参考时,并且因此具有增加的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险,则向受试者施用ITGA1抑制剂。在一些实施方案中,还向此类受试者施用肺病治疗剂。在一些实施方案中,当受试者对于ITGA1变体核酸分子是杂合的时,向受试者施用与标准剂量量相同或低于标准剂量量的剂量量的肺病治疗

剂,并且还向受试者施用ITGA1抑制剂。在一些实施方案中,受试者是ITGA1参考。在一些实施方案中,受试者对于ITGA1变体核酸分子是杂合的。

[0098] 本公开还提供了检测从受试者获得的生物样品中ITGA1变体基因组核酸分子和/或从受试者获得的生物样品中ITGA1变体mRNA分子和/或由从受试者获得的生物样品中的mRNA分子产生的ITGA1变体cDNA分子的存在或不存在的方法。应理解,群体内的基因序列和由此类基因编码的mRNA分子可因多态性诸如单核苷酸多态性而变化。本文提供的ITGA1变体基因组核酸分子、ITGA1变体mRNA分子和ITGA1变体cDNA分子的序列仅是示例性序列。ITGA1变体基因组核酸分子、变体mRNA分子和变体cDNA分子的其他序列也是可能的。

[0099] 生物样品可来源于来自受试者的任何细胞、组织或生物流体。生物样品可包括任何临床相关组织,诸如例如骨髓样品、肿瘤活检、细针抽吸物或体液样品,诸如血液、龈沟液、血浆、血清、淋巴、腹水、囊液或尿液。在一些实施方案中,生物样品包括口腔拭子。本文所公开的方法中使用的生物样品可基于测定形式、检测方法的性质以及用作样品的组织、细胞或提取物而变化。生物样品可根据所采用的测定进行不同处理。例如,当检测任何ITGA1变体核酸分子时,可采用设计用于分离或富集生物样品的ITGA1变体核酸分子的初步处理。多种技术可用于此目的。当检测任何ITGA1变体mRNA分子的水平时,可使用不同的技术富集生物样品的mRNA分子。可使用各种方法来检测mRNA分子的存在或水平或特定变体基因组DNA位点的存在。

[0100] 本公开还提供了检测受试者中ITGA1变体核酸分子或其互补物的方法。所述方法包括测定从受试者获得的生物样品以确定生物样品中的核酸分子是否是ITGA1变体核酸分子。

[0101] 在一些实施方案中,ITGA1变体核酸分子或其互补物是具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列的基因组核酸分子。在一些实施方案中,ITGA1变体核酸分子是具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列的mRNA分子。在一些实施方案中,ITGA1变体核酸分子是由具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列的生物样品中的mRNA分子产生的cDNA分子。

[0102] 在一些实施方案中,生物样品包含细胞或细胞裂解物。此类方法还可包括例如从受试者获得包含ITGA1基因组核酸分子或mRNA分子的生物样品,并且如果包含mRNA,则任选地将mRNA逆转录成cDNA。此类测定可包括例如确定特定ITGA1核酸分子的这些位置的同一性。在一些实施方案中,所述方法是体外方法。

[0103] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括对生物样品中ITGA1基因组核酸分子、ITGA1 mRNA分子或由mRNA分子产生的ITGA1 cDNA分子的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中所测序的部分包含导致功能丧失(部分或完全)或预测会导致功能丧失(部分或完全)的一种或多种变异。

[0104] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括对以下的至少一部分进行测序:i)生物样品中的ITGA1基因组核酸分子的核苷酸序列,其中所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置;ii)生物样品中的ITGA1 mRNA分子的核苷酸序列,其中所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置;和/或iii)由生物样品中的mRNA产生的ITGA1 cDNA分子的核苷酸序列,其中所测序的

部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置。当生物样品中的ITGA1基因组核酸分子的所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列时,则生物样品中的ITGA1核酸分子是ITGA1变体核酸分子。

[0105] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括对生物样品中的ITGA1基因组核酸分子的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置。当生物样品中的ITGA1基因组核酸分子的所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列时,则生物样品中的ITGA1核酸分子是ITGA1变体基因组核酸分子。

[0106] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括对生物样品中的ITGA1 mRNA分子的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置。当生物样品中的ITGA1 mRNA分子的所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列时,则生物样品中的ITGA1核酸分子是ITGA1变体mRNA分子。

[0107] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括对由生物样品中的mRNA分子产生的ITGA1 cDNA分子的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置。当生物样品中的ITGA1 cDNA分子的所测序的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列时,则生物样品中的ITGA1核酸分子是ITGA1变体cDNA分子。

[0108] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括:a)使生物样品与接触,所述引物与ITGA1的核苷酸序列的一部分杂交:i)基因组核酸分子或其互补物,其接近对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置;ii)mRNA分子或其互补物,其接近ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置;和/或iii)cDNA分子或其互补物,其接近对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置;b)使引物至少延伸通过ITGA1的核苷酸序列的位置:i)基因组核酸分子或其互补物,其对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置;ii)mRNA分子或其互补物,其对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置;和/或iii)cDNA分子或其互补物,其对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置;以及c)确定引物的延伸产物是否包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸。

[0109] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括:a)使生物样品与引物接触,所述引物与接近对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置的ITGA1基因组核酸分子或其互补物的核苷酸序列的一部分杂交;b)使引物至少延伸通过对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置的ITGA1基因组核酸分子或其互补物的核苷酸序列的位置;和c)确定引物的延伸产物是否包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸或其互补物的位置处的核苷酸。

[0110] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括:a)使生物样品与引物接触,所述引物与接近对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置的ITGA1 mRNA分子或其互补物的核苷酸序列的一部分杂交;b)使引物至少延伸通过对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置的ITGA1 mRNA分子的核苷酸序列的位置;和c)确定引物的延伸产物是否包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸或其互补物

的位置处的核苷酸。

[0111] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括:a)使生物样品与引物接触,所述引物与接近对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置的ITGA1 cDNA分子或其互补物的核苷酸序列的一部分杂交;b)使引物至少延伸通过对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置的ITGA1 cDNA分子的核苷酸序列的位置;和c)确定引物的延伸产物是否包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸或其互补物的位置处的核苷酸。

[0112] 在一些实施方案中,对整个核酸分子进行测序。在一些实施方案中,仅分析ITGA1基因组核酸分子。在一些实施方案中,仅分析ITGA1 mRNA。在一些实施方案中,仅分析从ITGA1 mRNA获得的ITGA1 cDNA。

[0113] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括:a)扩增生物样品中的ITGA1核酸分子或其互补物的至少一部分,其中所述扩增的部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸;b)用可检测标记来标记所扩增的核酸分子;c)使所标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所扩增的核酸分子的包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸或其互补物的位置处的核苷酸的核酸序列杂交的核苷酸序列。

[0114] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括:a)扩增生物样品中的ITGA1基因组核酸分子或其互补物的至少一部分,其中所述部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸;b)用可检测标记来标记所扩增的核酸分子;c)使所标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中改变特异性探针包含在严格条件下与所扩增的核酸分子的包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸或其互补物的位置处的核苷酸的核酸序列杂交的核苷酸序列;以及d)检测可检测标记。

[0115] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括:a)扩增生物样品中的ITGA1 mRNA分子或其互补物的至少一部分,其中所述部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸;b)用可检测标记来标记所扩增的核酸分子;c)使所标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中改变特异性探针包含在严格条件下与所扩增的核酸分子的包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸或其互补物的位置处的核苷酸的核酸序列杂交的核苷酸序列;以及d)检测可检测标记。

[0116] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括:a)扩增生物样品中的ITGA1 cDNA分子或其互补物的至少一部分,其中所述部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸;b)用可检测标记来标记所扩增的核酸分子;c)使所标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中改变特异性探针包含在严格条件下与所扩增的核酸分子的包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸或其互补物的位置处的核苷酸的核酸序列杂交的核苷酸序列;以及d)检测可检测标记。

[0117] 在一些实施方案中,核酸分子是mRNA,并且确定步骤还包括在扩增步骤之前将mRNA逆转录成cDNA。

[0118] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括:使生物样品中的ITGA1核酸分子或其互补物与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的ITGA1核酸分子或其互补物的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;以及检测可检测标记。

[0119] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括:使生物样品中的ITGA1基因组核酸分子或其互补物与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与ITGA1基因组核酸分子或其互补物的包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;以及检测可检测标记。

[0120] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括:使生物样品中的ITGA1 mRNA分子或其互补物与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的ITGA1 mRNA分子或其互补物的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;以及检测可检测标记。

[0121] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括:使由生物样品中的mRNA分子产生的ITGA1 cDNA分子或其互补物与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的ITGA1 cDNA分子或其互补物的核苷酸序列杂交的核苷酸序列;以及检测可检测标记。

[0122] 在一些实施方案中,ITGA1核酸分子存在于从受试者获得的细胞内。

[0123] 改变特异性聚合酶链式反应技术可用于检测核酸序列中的突变,诸如SNP。可使用改变特异性引物是因为当与模板存在失配时,DNA聚合酶将不延伸。

[0124] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括使生物样品与引物或探针接触,所述引物或探针诸如改变特异性引物或改变特异性探针,其在严格条件下与ITGA1变体基因组序列、变体mRNA序列或变体cDNA序列而不是对应的ITGA1参考序列特异性杂交,以及确定是否发生了杂交。

[0125] 在一些实施方案中,测定包括RNA测序(RNA-seq)。在一些实施方案中,测定还包括诸如通过逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)将mRNA逆转录成cDNA。

[0126] 在一些实施方案中,所述方法利用足够核苷酸长度的探针和引物以结合到靶核酸序列,并且特异性地检测和/或鉴定包含ITGA1变体基因组核酸分子、变体mRNA分子或变体cDNA分子的多核苷酸。杂交条件或反应条件可由操作人员确定以实现此结果。核苷酸长度可为足以用于所选择的检测方法(包括本文描述或例示的任何测定)的任何长度。此类探针和引物可在高严格杂交条件下与靶核苷酸序列特异性杂交。探针和引物可具有与靶核苷酸序列内连续核苷酸的完全核苷酸序列同一性,但可通过常规方法设计不同于靶核苷酸序列并保留特异性检测和/或鉴定靶核苷酸序列的能力的探针。探针和引物可与靶核酸分子的核苷酸序列具有约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%序列同一性或互补性。

[0127] 在一些实施例中,为了确定生物样品内的ITGA1核酸分子(基因组核酸分子、mRNA

分子或cDNA分子)或其互补物是否包含核苷酸序列,所述核苷酸序列包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸,可以使用引物对使生物样品进行扩增方法,所述引物对包括第一引物,其来源于与对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸相邻的5'侧翼序列;和第二引物,其来源于与对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸相邻的3'侧翼序列,以产生指示对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置处的SNP的存在的扩增子。在一些实施方案中,扩增子的长度范围可从引物对加一个核苷酸碱基对的组合长度至可通过DNA扩增方案产生的扩增子的任何长度。此距离的范围可从一个核苷酸碱基对多至扩增反应的极限,或约两万个核苷酸碱基对。任选地,引物对侧接包括对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置和在对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置的位置的每一侧上的至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个核苷酸的区域。

[0128] 可由mRNA和/或cDNA序列产生类似的扩增子。PCR引物对可以例如通过使用意图用于此目的的计算机程序来源于已知的序列,所述计算机程序诸如Vector NTI版本10的PCR引物分析工具(Informax Inc.,Bethesda Md.);PrimerSelect(DNASTAR Inc.,Madison, Wis.);以及Primer3(版本0.4.0.COPYRGT.,1991,Whitehead Institute for Biomedical Research,Cambridge,Mass.)。另外,可视觉扫描序列并使用已知指南手动鉴定引物。

[0129] 核酸测序技术的说明性实例包括但不限于链终止子(Sanger)测序和染料终止子测序。其他方法涉及除了测序以外的核酸杂交方法,其包括使用针对纯化的DNA、扩增的DNA和固定细胞制品的标记的引物或探针(荧光原位杂交(FISH))。在一些方法中,可在检测之前或在检测的同时对靶核酸分子进行扩增。核酸扩增技术的例示性实例包括但不限于聚合酶链式反应(PCR)、连接酶链式反应(LCR)、链置换扩增(SDA)以及基于核酸序列的扩增(NASBA)。其他方法包括但不限于连接酶链反应、链置换扩增反应和嗜热SDA(tSDA)。

[0130] 在杂交技术中,可采用严格条件,使得探针或引物特异性地与其靶标杂交。在一些实施方案中,在严格条件下的多核苷酸引物或探针将与其靶序列杂交,其程度可检测地比与其他非靶序列的杂交大诸如至少2倍、至少3倍、至少4倍或更多倍(相对于背景),包括大超过10倍(相对于背景)。在一些实施方案中,在严格条件下的多核苷酸引物或探针将与其靶核苷酸序列杂交,其程度可检测地比与其他核苷酸序列的杂交大至少2倍。在一些实施方案中,在严格条件下的多核苷酸引物或探针将与其靶核苷酸序列杂交,其程度可检测地比与其他核苷酸序列的杂交大至少3倍。在一些实施方案中,在严格条件下的多核苷酸引物或探针将与其靶核苷酸序列杂交,其程度可检测地比与其他核苷酸序列的杂交大至少4倍。在一些实施方案中,在严格条件下的多核苷酸引物或探针将与其靶核苷酸序列杂交,其程度可检测地比与其他核苷酸序列的杂交大超过10倍(相对于背景)。严格条件是序列依赖性的且在不同的环境中将是不同的。

[0131] 促进DNA杂交的适当严格性条件(例如6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC),在约45°C下,接着在50°C下进行2X SSC的洗涤)是已知的且可见于Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,N.Y.(1989),6.3.1-6.3.6。通常,用于杂交和检测的严格条件将是其中如下所述的那些:在pH 7.0至8.3时的盐浓度低于约1.5M Na⁺离子、通常约0.01至1.0M Na⁺离子浓度(或其他盐),并且温度对于短探针(诸如例如10个至50个核苷酸)是至少约30°C,并且对于较长探针(诸如例如大于50个核苷酸)是至少约60°C。还可通过添加去稳

定剂诸如甲酰胺来实现严格条件。任选地,洗涤缓冲液可包含约0.1%至约1% SDS。杂交的持续时间通常少于约24小时,通常为约4至约12小时。洗涤时间的持续时间将是至少足以达到平衡的时间长度。

[0132] 本公开还提供了检测ITGA1预测的功能丧失性多肽的存在的方法,其包括对从受试者获得的生物样品进行测定以确定生物样品中的ITGA1多肽是否含有致使多肽具有功能丧失(部分或完全)或预测的功能丧失(部分或完全)的一种或多种变异。ITGA1预测的功能丧失性多肽可以是本文所述的任何ITGA1预测的功能丧失性多肽。

[0133] 在一些实施方案中,所述方法包括对从受试者获得的生物样品进行测定以确定生物样品中的ITGA1多肽是否包含氨基酸序列,所述氨基酸序列包含由本文所述的任何ITGA1变体核酸分子编码的变异。

[0134] 在一些实施方案中,检测步骤包括对包含氨基酸序列的ITGA1多肽的至少一部分测序,所述氨基酸序列包含由本文所述的任何ITGA1变体核酸分子编码的变异

[0135] 在一些实施方案中,检测步骤包括用于检测包含氨基酸序列的ITGA1多肽的存在的免疫测定,所述氨基酸序列包含由本文所述的任何ITGA1变体核酸分子编码的变异。

[0136] 在一些实施方案中,当受试者不具有ITGA1预测的功能丧失性多肽时,受试者具有增加的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险。在一些实施方案中,当受试者具有ITGA1预测的功能丧失性多肽时,受试者具有降低的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险。

[0137] 本公开还提供了与ITGA1变体基因组核酸分子、ITGA1变体mRNA分子和/或ITGA1变体cDNA分子(诸如本文公开的基因组变体核酸分子、mRNA变体分子和cDNA变体分子中的任一种)杂交的分离的核酸分子。在一些实施方案中,此类分离的核酸分子在严格条件下与ITGA1变体核酸分子杂交。此类核酸分子可例如用作探针、引物、改变特异性探针或改变特异性引物,如本文所述或例示。

[0138] 在一些实施方案中,分离的核酸分子与包含对应于ITGA1变体核酸分子的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的ITGA1核酸分子的一部分杂交。

[0139] 在一些实施方案中,此类分离的核酸分子包含至少约5个、至少约8个、至少约10个、至少约11个、至少约12个、至少约13个、至少约14个、至少约15个、至少约16个、至少约17个、至少约18个、至少约19个、至少约20个、至少约21个、至少约22个、至少约23个、至少约24个、至少约25个、至少约30个、至少约35个、至少约40个、至少约45个、至少约50个、至少约55个、至少约60个、至少约65个、至少约70个、至少约75个、至少约80个、至少约85个、至少约90个、至少约95个、至少约100个、至少约200个、至少约300个、至少约400个、至少约500个、至少约600个、至少约700个、至少约800个、至少约900个、至少约1000个、至少约2000个、至少约3000个、至少约4000个或至少约5000个核苷酸或由其组成。在一些实施方案中,此类分离的核酸分子包含至少约5个、至少约8个、至少约10个、至少约11个、至少约12个、至少约13个、至少约14个、至少约15个、至少约16个、至少约17个、至少约18个、至少约19个、至少约20个、至少约21个、至少约22个、至少约23个、至少约24个或至少约25个核苷酸或由其组成。在一些实施方案中,分离的核酸分子包含至少约18个核苷酸或由其组成。在一些实施方案中,分离的核酸分子包含至少约15个核苷酸或由其组成。在一些实施方案中,分离的核酸分子包含约10个至约35个、约10个至约30个、约10个至约25个、约12个至约30个、约12个至约28

个、约12个至约24个、约15个至约30个、约15个至约25个、约18个至约30个、约18个至约25个、约18个至约24个或约18个至约22个核苷酸或由其组成。在一些实施方案中,分离的核酸分子包含约18个至约30个核苷酸或由其组成。在一些实施方案中,分离的核酸分子包含至少约15个核苷酸至至少约35个核苷酸或由其组成。

[0140] 在一些实施方案中,分离的核酸分子与核酸分子的至少约15个连续核苷酸杂交,所述核酸分子与ITGA1变体基因组核酸分子、ITGA1变体mRNA分子和/或ITGA1变体cDNA分子至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%相同。在一些实施方案中,分离的核酸分子包含约15个至约100个核苷酸或约15个至约35个核苷酸或由其组成。在一些实施方案中,分离的核酸分子包含约15个至约100个核苷酸或由其组成。在一些实施方案中,分离的核酸分子包含约15个至约35个核苷酸或由其组成。

[0141] 在一些实施方案中,分离的改变特异性探针或改变特异性引物包含至少约15个核苷酸,其中所述改变特异性探针或改变特异性引物包含与ITGA1变体核酸分子或其互补物的一部分的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述部分包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置的位置。

[0142] 在一些实施方案中,改变特异性探针和改变特异性引物包含DNA。在一些实施方案中,改变特异性探针和改变特异性引物包含RNA。

[0143] 在一些实施方案中,本文所述的探针和引物(包括改变特异性探针和改变特异性引物)具有与本文公开的任何核酸分子或其互补物特异性杂交的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述探针和引物在严格条件下与本文公开的核酸分子中的任一种特异性地杂交。

[0144] 在一些实施方案中,引物(包括改变特异性引物)可用于第二代测序或高通量测序中。在一些情况下,可修饰引物,包括改变特异性引物。特别地,引物可包含在例如大规模平行签名测序(MPSS)、聚合酶克隆测序(Polony sequencing)和454焦磷酸测序的不同步骤中使用的各种修饰。可在所述过程的几个步骤中使用修饰的引物,包括在克隆步骤中使用生物素化的引物,并且在珠粒装载步骤和检测步骤中使用荧光标记的引物。通常使用双端测序(paired-end)标签文库进行聚合酶克隆测序,其中每个DNA模板分子的长度为约135bp。在珠粒装载步骤和乳液PCR中使用生物素化的引物。在检测步骤中使用荧光标记的简并九聚物寡核苷酸。衔接子可包含用于将DNA文库固定到链霉亲和素包被的珠粒上的5'-生物素标签。

[0145] 本文所述的探针和引物可用于检测本文公开的ITGA1变体基因组核酸分子、ITGA1变体mRNA分子和/或ITGA1变体cDNA分子中的任一种内的核苷酸变异。本文所述的引物可用于扩增ITGA1变体基因组核酸分子、ITGA1变体mRNA分子或ITGA1变体cDNA分子或其片段。

[0146] 本公开还提供了包含上述引物中的任一种的引物对。

[0147] 在本公开的上下文中,“特异性杂交”意指探针或引物(诸如例如改变特异性探针或改变特异性引物)不与编码ITGA1参考基因组核酸分子、ITGA1参考mRNA分子和/或ITGA1参考cDNA分子的核酸序列杂交。

[0148] 在本公开通篇描述的任何实施方案中,探针(诸如例如改变特异性探针)可包含标记。在一些实施方案中,所述标记是荧光标记、放射性标记或生物素。

[0149] 本公开还提供了包含本文所公开的探针中的任一种或多种所附接的基底的支持

物。固体支持物是分子(诸如本文公开的探针中的任一种)可与其结合的固态基底或支持物。固体支持物的一种形式是阵列。固体支持物的另一种形式是阵列检测物。阵列检测物是多种不同的探针以阵列、网格或其他组织化模式与其偶联的固体支持物。固态基底的一种形式是微量滴定皿,诸如标准96孔类型。在一些实施方案中,可采用通常每孔含有一个阵列的多孔玻璃载片。在一些实施方案中,所述支持物是微阵列。

[0150] 在一些实施方案中,本文所述的方法中的任一种还可包括确定具有与降低的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险相关联的ITGA1变体核酸分子和/或ITGA1预测的功能丧失变体多肽的受试者的负荷。负荷是ITGA1基因中所有变体的集合,其可以在与肺病(诸如纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘)的关联分析中进行。在一些实施方案中,受试者对于与降低的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险相关的一种或多种ITGA1变体核酸分子是纯合的。在一些实施方案中,受试者对于与降低的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险相关的一种或多种ITGA1变体核酸分子是杂合的。关联分析的结果表明ITGA1变体核酸分子与降低的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险相关。当受试者具有较低的负荷时,与具有较高负荷的受试者相比,受试者具有增加的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险,并且向受试者施用或继续施用标准剂量量的肺病治疗剂和/或ITGA1抑制剂。当受试者具有较高的负荷时,与具有较低负荷的受试者相比,受试者具有降低的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险,并且向受试者施用或继续施用与标准剂量量相同或低于标准剂量量的量的肺病治疗剂。负荷越高,发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险越低。ITGA1变体核酸分子可以是具有本文所述的任何变异的任何ITGA1变体核酸分子。

[0151] 在一些实施方案中,具有任何一个或多个ITGA1变体核酸分子的受试者的负荷代表多个ITGA1变体核酸分子的加权集合。在一些实施方案中,使用存在于ITGA1基因中或其周围(高达10Mb)的至少约2个、至少约3个、至少约4个、至少约5个、至少约10个、至少约20个、至少约30个、至少约40个、至少约50个、至少约60个、至少约70个、至少约80个、至少约100个、至少约120个、至少约150个、至少约200个、至少约250个、至少约300个、至少约400个、至少约500个、至少约1,000个、至少约10,000个、至少约100,000个或至少约或超过1,000,000个遗传变体计算负荷,其中遗传负荷是等位基因数目乘以每个等位基因与纤维化肺病或相关结果的关联估计(例如加权多基因负荷得分)。这可包括在遗传关联分析中显示与纤维化肺病相关的性状非零关联的ITGA1基因(基因周围高达10Mb)附近的任何遗传变体,无论其基因组注释如何。在一些实施方案中,当受试者具有高于期望的阈值得分的负荷时,受试者具有降低的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险。在一些实施方案中,当受试者具有低于期望的阈值得分的负荷时,受试者具有增加的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险。

[0152] 在一些实施方案中,所述负荷可分为五分位数,例如,最高五分位数、中间五分位数和最低五分位数,其中负荷的最高五分位数对应于最低风险组,并且负荷的最低五分位数对应于最高风险组。在一些实施方案中,具有较大负荷的受试者包括最高加权负荷,包括但不限于受试者群体的负荷的前10%、前20%、前30%、前40%或前50%。在一些实施方案中,遗传变体包含关联的p值范围在前10%、前20%、前30%、前40%或前50%内的与纤维化

肺病相关的遗传变体。在一些实施方案中,每个鉴定的遗传变体包含与纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘相关的p值不超过约 10^{-2} 、约 10^{-3} 、约 10^{-4} 、约 10^{-5} 、约 10^{-6} 、约 10^{-7} 、约 10^{-8} 、约 10^{-9} 、约 10^{-10} 、约 10^{-11} 、约 10^{-12} 、约 10^{-13} 、约 10^{-14} 或约或为 10^{-15} 的遗传变体。在一些实施方案中,所鉴定的遗传变体包括与纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘相关的p值小于 5×10^{-8} 的遗传变体。在一些实施方案中,所鉴定的遗传变体包含与高风险受试者中的纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘相关联的遗传变体,与参考群体的其余部分相比,对于分布的前20%,比值比(OR)为约1.5或更大、约1.75或更大、约2.0或更大或约2.25或更大;或约1.5或更大、约1.75或更大、约2.0或更大、约2.25或更大、约2.5或更大或约2.75或更大。在一些实施方案中,比值比(OR)的范围可为约1.0至约1.5、约1.5至约2.0、约2.0至约2.5、约2.5至约3.0、约3.0至约3.5、约3.5至约4.0、约4.0至约4.5、约4.5至约5.0、约5.0至约5.5、约5.5至约6.0、约6.0至约6.5、约6.5至约7.0或大于7.0。在一些实施方案中,高风险受试者包括具有参考群体中的最低十分位数、五分位数或三分位数的负荷的受试者。负荷的阈值是根据预期实际应用的性质以及会被认为对所述实际应用有意义的风险差异来确定的。

[0153] 在一些实施方案中,当受试者被鉴定为具有增加的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险时,还向受试者施用如本文所述的肺病治疗剂和/或ITGA1抑制剂。例如,当所述受试者是ITGA1参考时,并且因此具有增加的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险,则向受试者施用ITGA1抑制剂。在一些实施方案中,还向此类受试者施用肺病治疗剂。在一些实施方案中,当受试者对于ITGA1变体核酸分子是杂合的时,向受试者施用与标准剂量量相同或低于标准剂量量的剂量的肺病治疗剂,并且还向受试者施用ITGA1抑制剂。在一些实施方案中,受试者是ITGA1参考。在一些实施方案中,受试者对于ITGA1变体核酸分子是杂合的。此外,当受试者具有较低的ITGA1变体核酸分子负荷,并且因此具有增加的发展成纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的风险时,向受试者施用肺病治疗剂。在一些实施方案中,当受试者具有较低的ITGA1变体核酸分子负荷时,向受试者施用与向具有较大ITGA1变体核酸分子负荷的受试者施用的标准剂量量相同或更大的剂量的肺病治疗剂。

[0154] ITGA1参考基因组核酸分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:1中所示。

[0155] ITGA1参考mRNA分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:2中所示。另一ITGA1参考mRNA分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:2中所示。另一ITGA1参考mRNA分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:3中所示。另一ITGA1参考mRNA分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:5中所示。

[0156] ITGA1参考cDNA分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:6中所示。另一ITGA1参考cDNA分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:7中所示。另一ITGA1参考cDNA分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:8中所示。另一ITGA1参考cDNA分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:9中所示。

[0157] 基因组核酸分子、mRNA分子和cDNA分子可来自任何生物体。例如,基因组核酸分子、mRNA分子和cDNA分子可以是人的或来自另一生物体(诸如非人哺乳动物、啮齿动物、小鼠或大鼠)的直系同源物。应理解,群体内的基因序列可由于多态性(诸如单核苷酸多态性)而变化。本文提供的实例仅为示例性序列。其他序列也是可能的。

[0158] 本文还提供了可以与所公开的核酸分子相互作用的功能性多核苷酸。功能性多核苷酸的实例包括但不限于反义分子、适体、核酶、三链体形成分子以及外部指导序列。功能

性多核苷酸可作为靶分子所具有的特异性活性的效应物、抑制剂、调节剂和刺激物,或功能性多核苷酸可具有独立于任何其他分子的从头活性。

[0159] 分离的核酸分子或其互补物也可存在于宿主细胞内。在一些实施方案中,宿主细胞可包含载体,所述载体包含本文所述的任何核酸分子或其互补物。在一些实施方案中,核酸分子可操作地连接至在宿主细胞中具有活性的启动子。在一些实施方案中,启动子是外源启动子。在一些实施方案中,启动子是诱导型启动子。在一些实施方案中,宿主细胞是细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是细菌细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是酵母细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是昆虫细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞。

[0160] 用于哺乳动物宿主细胞表达的所需调控序列可包括例如指导哺乳动物细胞中的高水平多肽表达的病毒元件,诸如来源于逆转录病毒LTR、巨细胞病毒(CMV)(诸如例如CMV启动子/增强子)、猿猴病毒40(SV40)(诸如例如SV40启动子/增强子)、腺病毒(诸如例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))的启动子和/或增强子、多瘤病毒和哺乳动物强启动子(诸如天然免疫球蛋白和肌动蛋白启动子)。在细菌细胞或真菌细胞(诸如例如酵母细胞)中表达多肽的方法也是众所周知的。启动子可为例如组成型活性启动子、条件启动子、诱导型启动子、时间受限型启动子(诸如例如发育调控型启动子)或空间受限型启动子(诸如例如细胞特异性或组织特异性启动子)。

[0161] 核酸分子内的核苷酸序列或多肽内的氨基酸序列的特定伸长段之间的同一性百分比(或互补性百分比)可使用BLAST程序(基本局部比对搜索工具)和PowerBLAST程序(Altschul等人,J.Mol.Biol.,1990,215,403-410;Zhang和Madden,Genome Res.,1997,7,649-656)或通过使用Gap程序(Wisconsin序列分析包,用于Unix的版本8,Genetics Computer Group,University Research Park,Madison Wis.)使用默认设置(其使用Smith和Waterman的算法(Adv.Appl.Math.,1981,2,482-489))来常规确定。在本文中,如果提及到序列同一性百分比,则较高的序列同一性百分比相对于较低的序列同一性百分比是优选的。

[0162] 如本文所用,当在特定核苷酸或核苷酸序列或位置的编号的上下文中使用时,短语“对应于”或其语法变型是指当特定核苷酸或核苷酸序列与参考序列(诸如例如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:6)比较时指定参考序列的编号。换句话说,特定聚合物的残基(诸如例如核苷酸或氨基酸)编号或残基(诸如例如核苷酸或氨基酸)位置相对于参考序列来指定,而不是通过残基在特定核苷酸或核苷酸序列内的实际数值位置来指定。例如,特定核苷酸序列可通过引入缺口以优化两个序列之间的残基匹配来与参考序列比对。在这些情况下,虽然存在缺口,但是对特定核苷酸或核苷酸序列中的残基的编号是相对于与其所比对的参考序列来进行的。

[0163] 如本文所述,例如,通过在特定ITGA1核酸分子的核苷酸序列与变体核酸分子的核苷酸序列之间进行序列比对,可以鉴定ITGA1变体基因组核酸分子内对应于变体位置的位置。存在多种可用于进行序列比对以鉴定对应于例如ITGA1变体核酸分子的变体位置的核苷酸位置的计算算法。例如,通过使用NCBI BLAST算法(Altschul等人,Nucleic Acids Res.,1997,25,3389-3402)或CLUSTALW软件(Sievers和Higgins,Methods Mol.Biol.,2014,1079,105-116),可进行序列比对。然而,序列也可手动地进行比对。

[0164] ITGA1参考多肽的氨基酸序列示于SEQ ID NO:10(同种型1)和SEQ ID NO:11(同种型2)中。参考SEQ ID NO:10(同种型1),ITGA1参考多肽的长度为1,179个氨基酸。参考SEQ ID NO:11(同种型2),ITGA1参考多肽的长度为1,173个氨基酸。

[0165] 所附序列列表中列出的核苷酸序列和氨基酸序列是使用核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三字母代码示出的。所述核苷酸序列遵循从序列的5'端开始且前进(即在每一行中从左到右)至3'端的标准惯例。仅示出了每一个核苷酸序列的一条链,但应理解的是,互补链是通过对所展示链的任何参考而被包括在内的。氨基酸序列遵循从序列的氨基末端开始且前进(即在每一行中从左到右)至羧基末端的标准惯例。

[0166] 本公开还提供了用于治疗受试者的纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的肺病治疗剂(或用于制备用于治疗纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的药物),其中所述受试者具有本文所述的ITGA1变体基因组核酸分子、变体mRNA分子和/或变体cDNA分子中的任一种。肺病治疗剂可以是本文所述的任何肺病治疗剂。

[0167] 在一些实施方案中,所述受试者被鉴定为具有ITGA1变体基因组核酸分子,其中所述基因组核酸分子具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

[0168] 在一些实施方案中,所述受试者被鉴定为具有ITGA1变体mRNA分子,其中所述mRNA分子具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

[0169] 在一些实施方案中,所述受试者被鉴定为具有ITGA1变体cDNA分子,其中所述cDNA分子具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

[0170] 在一些实施方案中,所述受试者被鉴别为具有:i) ITGA1变体基因组核酸分子,其具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列;ii) mRNA分子,其具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列;或iii) cDNA分子,其具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

[0171] 在一些实施方案中,受试者被鉴定为具有ITGA1变体基因组核酸分子,其具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

[0172] 在一些实施方案中,受试者被鉴定为具有ITGA1变体mRNA分子,其具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

[0173] 在一些实施方案中,受试者被鉴定为具有ITGA1变体cDNA分子,其具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

[0174] 在一些实施方案中,受试者被鉴定为具有包含氨基酸序列的ITGA1预测的功能丧失性多肽,所述氨基酸序列包含由本文所述的任何ITGA1变体核酸分子编码的变异。

[0175] 本公开还提供了用于治疗受试者的纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘(或用于制备用于治疗纤维化肺病、肺纤维化、间质性肺病、COPD或哮喘的药物)的ITGA1抑制剂,其中所述受试者对于本文所述的ITGA1变体基因组核酸分子、变体mRNA分子和/或变体cDNA分子中的任一种是杂合的,或者其中所述受试者是ITGA1基因组核酸分子、mRNA分

子或cDNA分子的参考。ITGA1抑制剂可以是本文所述的任何ITGA1抑制剂。

[0176] 在一些实施方案中,受试者是ITGA1基因组核酸分子、ITGA1mRNA分子或ITGA1 cDNA分子的参考。在一些实施方案中,受试者是ITGA1基因组核酸分子的参考。在一些实施方案中,受试者是ITGA1 mRNA分子的参考。在一些实施方案中,受试者是ITGA1cDNA分子的参考。

[0177] 在一些实施方案中,所述受试者被鉴定为对于ITGA1变体基因组核酸分子是杂合的,其中所述基因组核酸分子具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

[0178] 在一些实施方案中,受试者被鉴定为对于ITGA1变体mRNA分子是杂合的,其中所述mRNA分子具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

[0179] 在一些实施方案中,受试者被鉴定为对于ITGA1变体cDNA分子是杂合的,其中所述cDNA分子具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

[0180] 在一些实施方案中,所述受试者被鉴定为对于以下各项是杂合的:i) ITGA1变体基因组核酸分子,其具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列;ii) ITGA1变体mRNA分子,其具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列;或iii) ITGA1变体cDNA分子,其具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

[0181] 在一些实施方案中,所述受试者被鉴定为对于ITGA1变体基因组核酸分子是杂合的,所述ITGA1变体基因组核酸分子具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

[0182] 在一些实施方案中,所述受试者被鉴定为对于ITGA1变体mRNA分子是杂合的,所述ITGA1变体mRNA分子具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

[0183] 在一些实施方案中,所述受试者被鉴定为对于ITGA1变体cDNA分子是杂合的,所述ITGA1变体cDNA分子具有包含对应于ITGA1变体核酸分子或其互补物的变体位置处的核苷酸的位置处的核苷酸的核苷酸序列。

[0184] 以上或以下所引用的所有专利文献、网站、其他出版物、登录号等均出于所有目的以引用的方式整体并入,其程度犹如每个单独项目均具体地且单独地被指示为以引用的方式如此并入一样。如果序列的不同版本与不同时间的登录号相关,则意指与本申请的有效提交日期的登录号相关的版本。有效提交日期意指实际提交日期或参考登录号的优先权申请的提交日期(如果适用)中较早的日期。同样,如果出版物、网站等的不同版本在不同时间公布,则除非另有说明,否则意指在本申请的有效提交日期最近公布的版本。除非另有特别说明,否则本公开的任何特征、步骤、要素、实施方案或方面可与任何其他特征、步骤、要素、实施方案或方面组合使用。尽管出于清楚和理解的目的已通过说明和实例详细描述本公开,但将显而易见的是,可在所附权利要求的范围内实施某些变化和修改。

[0185] 提供以下实施例来更详细地描述实施方案。它们意图说明但不限制所要求保护的

实施方案。以下实施例为本领域普通技术人员提供本文所述的化合物、组合物、制品、装置和/或方法如何制备和评价的公开和描述,并且意图仅仅是示例性的且不意图限制任何权利要求的范围。已经努力确保关于数字(诸如例如量、温度等)的准确性,但可考虑一些误差和偏差。除非另外说明,否则份数是重量份,温度是以°C计或处于环境温度,并且压力处于或接近大气压。

[0186] 实施例

[0187] 实施例1:ITGA1中的功能丧失变体与改善的肺功能之间的关联

[0188] 检查了常见和罕见变体与三种肺功能性状之间的相关性:1秒用力呼气量(FEV1)、用力肺活量(FVC)和比率FEV1/FVC,其是气道阻塞的量度。鉴定出ITGA1中的罕见(次要等位基因频率<1%)预测的功能丧失变体与改善的肺功能之间的关联(更大的FEV1/FVC比率;图1)。还观察到了朝向保护免于哮喘和COPD的名义关联趋势,表明ITGA1的损失改善肺功能并且可以在哮喘/COPD或其他纤维化肺病中是保护性的(图2)。

[0189] 除了本文所述的那些修改之外,所描述主题的各种修改对于本领域技术人员来说将从前述描述中显而易见。此类修改也意图落在随附权利要求书的范围内。本申请中引用的每篇参考文献(包括但不限于期刊文章、美国和非美国专利、专利申请公布、国际专利申请公布、基因库登录号等)均通过引用以其整体且出于所有目的并入本文中。

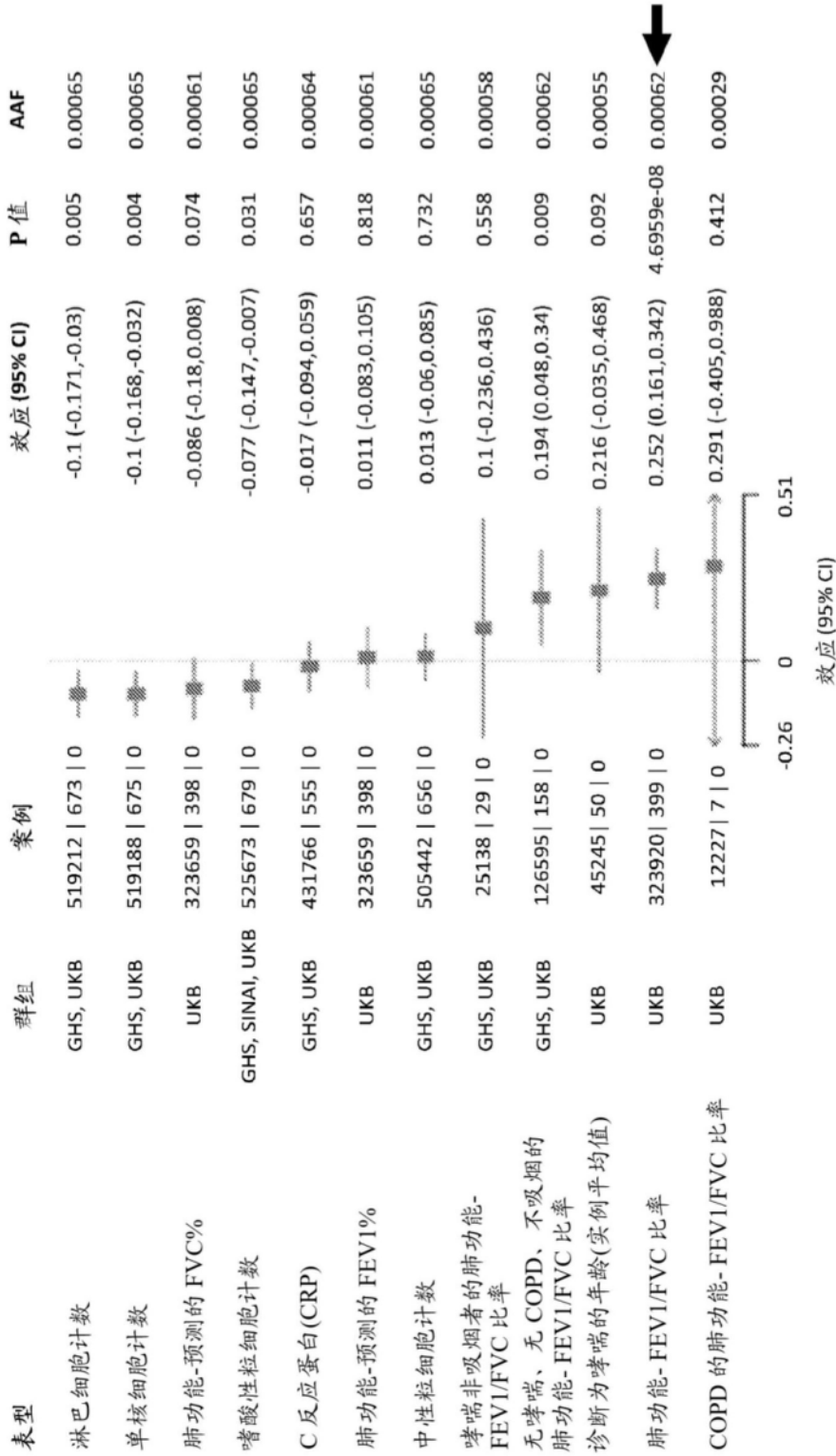


图1

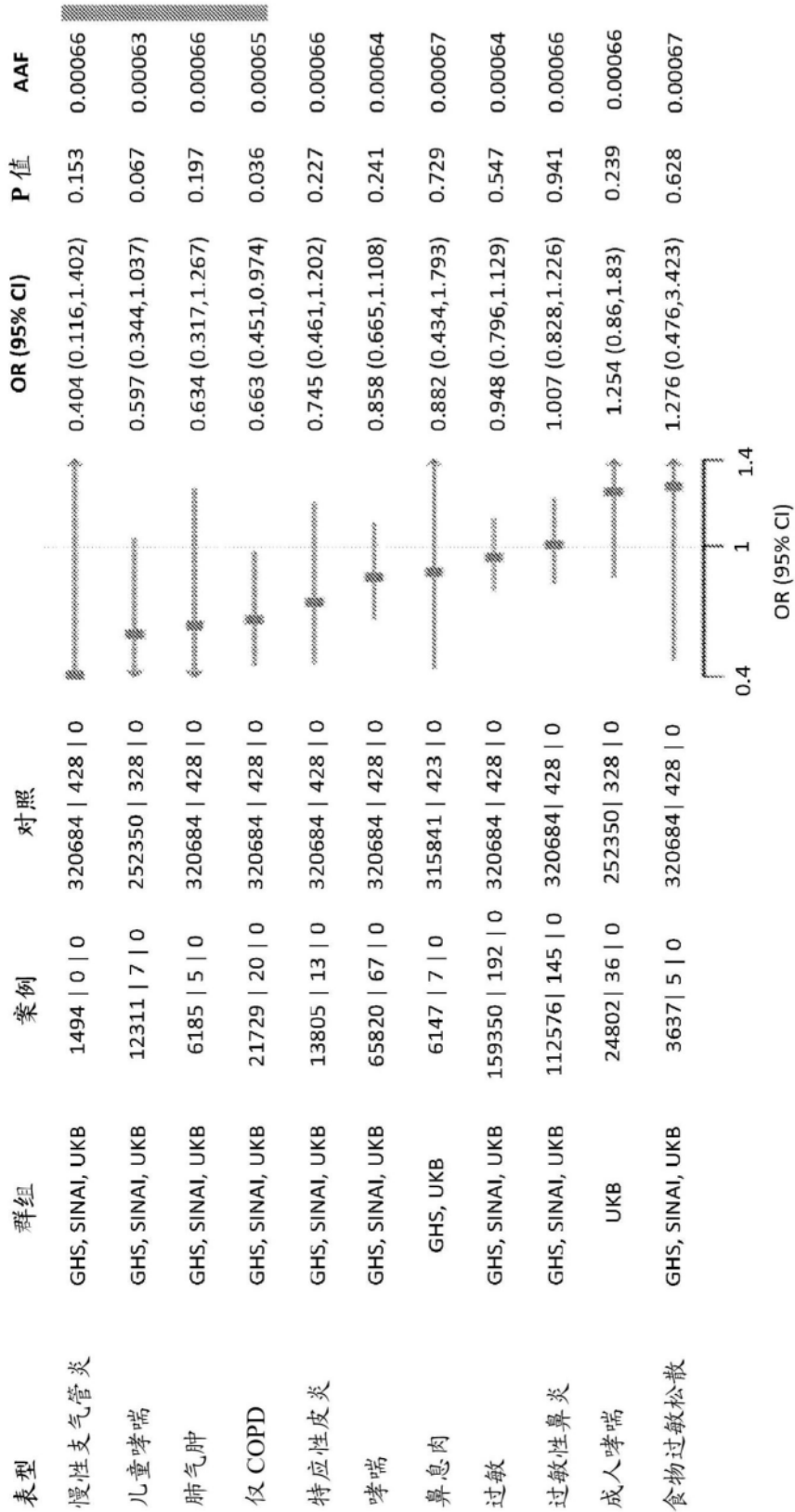


图2