



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118773299 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 15

(21) 申请号 202410778975.0

(22) 申请日 2017.03.17

(30) 优先权数据

62/309,817 2016.03.17 US

62/457,048 2017.02.09 US

(62) 分案原申请数据

201780030727.6 2017.03.17

(71) 申请人 西达-赛奈医疗中心

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 丽贝卡·贡斯基 S·R·塔尔干

理查德·L·迪姆

菲利普·弗雷什纳 D·P·麦戈文

J·比尔斯伯勒

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 王玉桂 武晶晶

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6883 (2018.01)

权利要求书1页 说明书48页

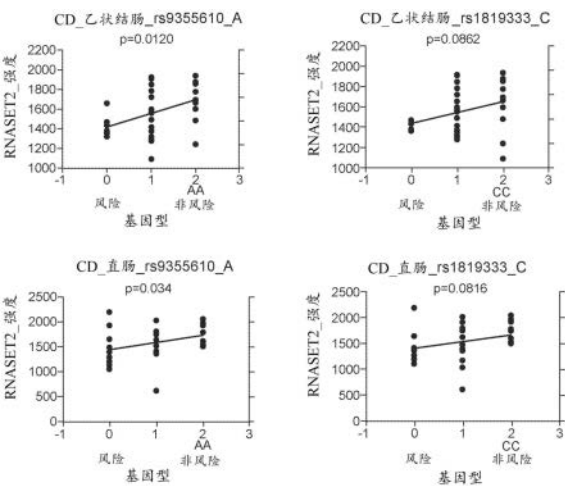
序列表(电子公布) 附图53页

(54) 发明名称

通过RNASET2诊断炎性肠病的方法

(57) 摘要

本发明描述了使用RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 诊断炎性肠病的方法,所述炎性肠病包括但不限于克罗恩病(CD)、溃疡性结肠炎(UC)和/或医学难治性溃疡性结肠炎(MR-UC)。本发明进一步提供了用于患者鉴别和/或分层的方法。



1. 一种用于评估来自受试者的样品的方法,该方法包括:
 - a) 接收样品中与疾病状态相关的基因型的存在或不存在,所述基因型包括rs2149092处的单核苷酸多态性,其中rs2149092处的单核苷酸多态性是SEQ ID NO:2中核位501处的“T”;
 - b) 采用算法将使用基因型的存在与否将样本分类为(i) 炎症性肠病(IBD)或正常样本,以及(ii) IBD的严重疾病表型或IBD的非严重疾病表型中的至少一种;以及
 - c) 提供所述分类的信息。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述IBD为克罗恩病(CD)。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述IBD为溃疡性结肠炎(UC)。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述IBD为难治性。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述IBD的严重疾病表型的特征为抗肿瘤坏死因子 α 疗法的治疗失败,每年多次发作,狭窄性疾病,穿透性疾病以及狭窄和穿透性疾病。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述IBD的严重疾病表型的特征为抗肿瘤坏死因子 α 疗法的治疗失败。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述IBD的严重疾病表型的特征为每年多次发作。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述IBD的严重疾病表型的特征为狭窄性疾病、穿透性疾病或狭窄和穿透性疾病。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述样品包括全血、血浆、血清或组织。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述基因型是通过用选自定量聚合酶链反应、单核苷酸多态性阵列和测序组成的基因型分型测定分析样品获得的。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述基因型还包括rs7848647处的单核苷酸多态性。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述基因型还包括在rs1819333、rs9355610或rs6478109处的单核苷酸多态性。
13. 根据权利要求12的方法,其中所述rs1819333处的单核苷酸多态性对应于SEQ ID NO:1中核位501处的“T”等位基因。
14. 根据权利要求12的方法,其中rs9355610处的单核苷酸多态性对应于SEQ ID NO:3中核位501处的“G”等位基因。
15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述信息还包括用于治疗IBD的治疗剂。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述算法被配置成将样品分类为适合于用治疗剂治疗的IBD或IBD的严重疾病表型。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述治疗剂包括抗肿瘤坏死因子超家族成员15(TL1A)治疗。
18. 根据权利要求16所述的方法,其中所述治疗剂包含重组核糖核酸酶T2(RNASET2)多肽或蛋白质。
19. 根据权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述样品的分类为(i) 炎症性肠病(IBD)或正常样品,以及(ii) 所述IBD的严重疾病表型或所述IBD的非严重疾病表型。
20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述IBD为UC,所述UC的严重疾病表型为医学难治性UC。

通过RNASET2诊断炎性肠病的方法

[0001] 本申请是申请日为2017年03月17日、申请号为201780030727.6、发明名称为“通过RNASET2诊断炎性肠病的方法”的中国专利申请(其对应PCT申请的申请日为2017年03月17日、申请号为PCT/US2017/023082)的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及炎性肠病和RNASET2作为针对疾病严重程度和靶向抗TL1A疗法的生物标志物。

发明背景

[0004] 本文所有出版物均通过引用并入本文,其程度如同特别地且单独地指出每个单独的出版物、或专利申请均通过引用而并入。以下描述包含可能有助于理解本发明的信息。这并非承认本文提供的任何信息是现有技术或与当前要求保护的发明相关,或明确或暗含引用的任何出版物是现有技术。

[0005] 炎性肠病(IBD)具有两种常见形式,即克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC),是慢性、复发性的胃肠道炎症性疾病。德系犹太人IBD的发病率较高、IBD的家族聚集性以及同卵双胞胎与异卵双胞胎相比IBD的一致性较高,证明遗传因素在IBD发病机制中发挥重要作用(S.Vermeire,P.Rutgeerts,Genes Immun 6,637(2005))。此外,遗传分析已将IBD与特定的遗传变体相联系。CD和UC被认为是一些遗传易感性基因座相同而其他基因座不同的相关病症。

[0006] 通常认为通过对共生菌群不当的免疫应答在遗传易感个体中触发IBD。CD和UC较高的临床异质性和遗传复杂性表明,驱动疾病的潜在生物学途径在患者亚组中几乎一定不同。因此,早期治疗和靶向疗法的发展需要亚组分层和预后生物标志物鉴别,特别是在预测与严重病程相比的总体轻度的病程时。尽管已经鉴别了201个IBD易感性基因座,但关于它们的功能意义知之甚少。TNFSF15的遗传变异与多个群体中的CD相关,并且TNFSF15编码的蛋白质TL1A是粘膜炎症的关键中介物。在CD和UC中,TL1A表达在肠的发炎区域中上调。在IBD患者中,升高的TL1A水平与TNFSF15基因型和疾病严重程度相关。TL1A的血清/组织水平升高的CD患者发生纤维化/狭窄性疾病行为的风险增加。在体外,TL1A与白介素12(IL-12)和白介素18(IL-18)(12/18)协同作用,从而导致IFN- γ 的产生快速增强,这是粘膜炎症的另一种关键中介物。

[0007] 因此,本领域仍需要诊断和鉴别患者以治疗IBD、CD、UC和/或MR-UC的方法。

附图说明

[0008] 示例性实施方案在附图中示出。意在说明本文公开的实施方案和附图被认为是说明性的而非限制性的。

[0009] 图1描绘了根据本发明的各个实施方案的未累及的小肠中的RNASET2 eQTL微阵列。

[0010] 图2示出了根据本发明的各个实施方案,RNASET2主要等位基因与CD患者的乙状结肠和直肠中RNASET2的表达降低相关。

[0011] 图3示出了根据本发明的各个实施方案,RNASET2主要等位基因与UC患者的乙状结肠和直肠中RNASET2的表达降低相关。

[0012] 图4示出了根据本发明的各个实施方案,RNASET2风险等位基因与CD和UC患者的发炎的大肠中RNASET2的表达降低相关。对于rs1819333观察到类似的结果。

[0013] 图5示出了根据本发明的各个实施方案,RNASET2主要等位基因与来自CD手术的小肠中RNASET2的表达降低相关。

[0014] 图6描绘了根据本发明的各个实施方案,EBV转化的B细胞系中的RNASET2 eQTL。主要等位基因与EBV转化的B细胞系中RNASET2 mRNA的表达水平较低相关。

[0015] 图7描绘了根据本发明的各个实施方案,IL-12、IL-18和/或TL1A治疗后的RNASET2表达。

[0016] 图8A-图8C描绘了根据本发明各个实施方案,CD患者中的RNASET2表达。A) 每年疾病发作或0次或1次或者多次疾病发作的患者中的RNASET2表达。B) 医学难治性从而需要手术干预以进行疾病管理或无需手术的患者中TL1A治疗后的RNASET2表达。C) 基于32名CD患者每年疾病发作的RNASET2表达,包含额外的数据样品。

[0017] 图9示出了根据本发明的各个实施方案,具有RNASET2风险等位基因的IBD患者中RNASET2的表达降低。

[0018] 图10描绘了根据本发明的各个实施方案,CD和UC患者中的RNASET2甲基化相对于GWAS p值。

[0019] 图11描绘了根据本发明的各个实施方案,难治性IBD中RNASET2的eQTL。使用Illumina表达阵列,RNASET2 SNP(rs2149085、rs1819333和rs9355610)来自需要手术干预以进行疾病管理的11名CD患者和10名UC患者的CD3+外周T细胞。

[0020] 图12描绘了根据本发明的各个实施方案,使用Agilent表达阵列的85名CD患者的CD小肠(回肠)手术切除中RNASET2的eQTL。

[0021] 图13A-图13D描绘了根据本发明的各个实施方案,难治性IBD中RNASET2的mQTL。A) 难治性IBD中RNASET2的mQTL,以及B) 正常或轻度疾病患者中RNASET2的mQTL。C) 来自需要手术干预以进行疾病管理的患有难治性疾病的20名CD患者的CD3+外周T细胞的mQTL(cg25258033),以及D) 对IBD疗法有应答的患者和9名正常患者对照的CD3+外周T细胞的mQTL,包含额外的数据样品。

[0022] 图14A-图14B描绘了根据本发明的各个实施方案,患有难治性或轻度疾病患者中eQTL和mQTL在RNASET2上的绘图。A) 在患有难治性或轻度疾病的患者中,eQTL和mQTL在RNASET2上的绘图。B) 使用来自患有难治性或轻度疾病(包括正常患者)的患者的外周和粘膜隔室的CD3+T细胞计算的eQTL和mQTL,包含额外的数据样品。

[0023] 图15描绘了根据本发明的各个实施方案,用IL-12、IL-18和/或TL1A刺激的CD4+T细胞的分选和IFN γ 表达。侧向散射相对于CD4+T细胞的IFN- γ 的直方图,该CD4+T细胞用来自四个供体(D1-4)的重组人IL-12(500pg/ml)和IL-18(50ng/ml)和TL1A(100ng/ml)刺激8小时。

[0024] 图16描绘了根据本发明的各个实施方案,使用中心相关性和平均连锁的层次聚类

的树状图。

[0025] 图17描绘了根据本发明的各个实施方案,基于表达水平对分泌IFN γ 和不分泌IFN γ 的亚组进行分类的类别预测分析。764个预测物基因的热图。

[0026] 图18描绘了根据本发明的各个实施方案,相对于其他区域在GWAS中提高的差异表达的基因的比例。

[0027] 图19描绘了根据本发明的各个实施方案,T细胞中183个转录IBD相关的SNP区域。

[0028] 图20描绘了根据本发明的各个实施方案,IBD风险预测物基因的类别预测物GWAS转录物的火山图。

[0029] 图21A-图21B示出了根据本发明的各个实施方案,沉默RNASET2增强IFN- γ 分泌。A) RNASET2 siRNA对RNASET2的抑制。B) RNASET2沉默对IFN- γ 分泌的影响。与用对照乱序siRNA转染的细胞相比,用RNASET2 siRNA转染的细胞中的IFN- γ 表达增强。

[0030] 图22示出了根据本发明的各个实施方案,IFN- γ 与RNASET2表达逆相关。

[0031] 图23示出了根据本发明的各个实施方案,21名IBD患者的CD3⁺T细胞 (cg25258033, 位于第一内含子内1.4kb处) 中RNASET2甲基化与表达负相关。

[0032] 图24A-图24D描绘了根据本发明的各个实施方案,使用RNA-seq的来自需要手术干预以进行疾病管理的患有难治性疾病的患者的CD3⁺T细胞中RNASET2与TNFSF15表达的相关性。A) 难治性CD中RNASET2与TL1A的相关性。B) 来自38名CD患者的CD3⁺外周T细胞中RNASET2与TNFSF15表达的相关性,C) 描绘了来自100名CD患者的数据,以及D) 描绘了来自138名患者的组合数据。

[0033] 图25A-图25B描绘了本发明的各个实施方案,RNASET2与A) PU.1和B) ELF1的相关性表达。风险SNP rs2149092C/T (SEQ ID NO:2) 消除了IRF4、PU.1和ELF-1结合位点。C-非风险等位基因,T=风险等位基因。

[0034] 图26描绘了根据本发明的各个实施方案,21名IBD患者中位于RNASET2转录起始位点的100kb内的表达和甲基化的相关性。

[0035] 图27描绘了根据本发明的各个实施方案,CD4⁺T细胞中产生IFN- γ 水平和不产生IFN- γ 水平的IFN- γ 表达。

[0036] 图28描绘了根据本发明的各个实施方案,GWAS p值与eQTL p值在RNASET2基因座上的相关性。GWAS p值基于来自18729名CD患者和34897名对照的数据。eQTL p值基于基因型分型和RNA-seq,该RNA-seq基于需要手术干预以进行疾病管理的患有难治性疾病的71名CD患者的RNASET2表达。

[0037] 图29描绘了根据本发明的各个实施方案,RNASET2沉默对IFN- γ 分泌的影响。在所有实验中,RNASET2特异性siRNA对RNASET2表达的抑制大于50%。

[0038] 图30描绘了根据本发明的各个实施方案,RNASET2表达降低与ASCA血清阳性的关联。

[0039] 图31描绘了根据本发明的各个实施方案,RNASET2表达降低与穿透性疾病的关联。基于蒙特利尔疾病分类 (B1、B2和B3) 的71名CD患者通过RNA-seq的RNASET2表达。

[0040] 图32描绘了根据本发明的各个实施方案,具有RNASET2疾病相关SNP的患者表现出更短的再次手术时间。对于接受多次手术的154名CD患者,基于携带IBD风险SNP rs9355610 (SEQ ID NO:3) 的手术之间的时间。

[0041] 图33描绘了rs2149092SNP (SEQ ID NO:2) 改变DNA形状。

[0042] 图34描绘了根据本发明的各个实施方案,RNASET2与Ets1表达的相关性。

[0043] 图35描绘了rs2149092SNP (SEQ ID NO:2) 扭曲Ets1结合位点处的DNA形状。

[0044] 图36A-图36C描绘了根据本发明的各个实施方案,RNASET2疾病相关变体rs2149092 (SEQ ID NO:2) 的潜在调控功能和RNASET2变体rs2149092 (C-非风险等位基因/T-风险等位基因) 的预期调控作用的鉴别。A) 针对ETS和IRF4转录因子的结合基序中的rs2149092C到T变异的预测破坏。变体基序中的中央ETS下划线示出。B) ETS1、IRF4和SPI1转录因子结合以及与rs2149092变体周围的基因组序列对齐的组蛋白H3K4me1和H3K4ac的CHIP-seq和组蛋白修饰谱。C) 使用RNA-seq,来自需要手术干预以进行疾病管理的108名CD患者的CD3+外周T细胞中RNASET2与多种ETS和JUN转录因子的表达的相关性。

[0045] 图37A-图37G描绘了根据本发明的各个实施方案,RNASET2沉默对IFN- γ 分泌和细胞聚集的影响。A) RNASET2 siRNA或对照 (NC) siRNA对RNASET2表达的沉默。B) RNASET2沉默对IFN- γ 分泌的影响。图A和图B代表7个实验 (图29) 中具有相似结果的6个实验。C) CD4+T细胞未经处理 (UT) 或D) CD4+T细胞经TL1A刺激24小时。通过流式细胞术测量细胞内IFN- γ 染色和细胞聚集。对细胞分泌IFN- γ 的群体和非分泌IFN- γ 的群体 (左图) 进行门控,并然后使用碘化丙锭 (PI) 分析单细胞部分和聚集细胞部分 (直方图,右图)。每个直方图中的第一个峰对应于单细胞 (黑色组),而剩余的峰对应于细胞聚集体 (灰色组)。代表4个实验。E) TL1A刺激后,分泌IFN- γ (IFN- γ +) 的群体和不分泌IFN- γ (IFN- γ -) 的群体中单细胞和细胞聚集体的比例。F) 分泌IFN- γ 的细胞数的增加倍数 (4个实验的平均值)。G) 在TL1A刺激之前,用对照IgG或LFA1阻断Ab (aLFA1) 预处理CD4+T细胞。通过ELISA测量的LFA1介导的IFN- γ 分泌阻断的总p值为0.047。

[0046] 图38描绘了根据本发明的各个实施方案,手术时RNASET2疾病风险变体SNP与巯基嘌呤或抗TNF疗法的治疗失败、ANCA血清阳性和肠切除长度增加的关联 (数据总结在表18中)。

[0047] 图39描绘了根据本发明的各个实施方案,在未接受术后预防的38名患者中RNASET2疾病风险变体SNP与疾病复发的关联。进行术后内镜检查并按Rutgeerts评分进行分类 (数据总结在表18中)。

[0048] 图40描绘了RNASET2基因座的组织特异性功能注释。来自REMC的H3K4me3、H3K4me1和RNAseq数据的热图。

[0049] 图41描绘了使用RNA-seq,来自患有难治性疾病的108名CD患者的CD3+外周T细胞中RNASET2表达与多种ETS和IRF4转录因子的相关性。

[0050] 图42描绘了根据本发明的各个实施方案,图示出用对照 (NC) siRNA或RNASET2 siRNA沉默后相对于未处理细胞,CD4+T细胞中指定基因的蛋白质表达的热图。结果来自4名健康供体。右栏描绘了与不分泌IFN- γ 的CD4+T细胞相比,分泌IFN- γ 的CD4+T细胞中的差异基因表达。

[0051] 图43描绘了根据本发明的各个实施方案,基于IgG ASCA血清阳性 (左图) 或者抗TNF (中图) 或巯基嘌呤 (右图) 的术前治疗失败,与71名CD患者的ICAM1表达水平 (通过RNA-seq测量) 相关的临床疾病参数。

具体实施方式

[0052] 本文引用的所有参考文献均通过引用整体并入本文,如同对其充分阐述。与RNASET2相关的序列也通过引用整体并入,如同经由公开的rs号充分阐述。除非另有定义,否则本文使用的技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology第3版修订版,J.Wiley&Sons (New York,NY 2006);和Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press(Cold Spring Harbor,NY 2012)为本领域技术人员提供了对本申请中使用的许多术语的一般指导。关于如何制备抗体的参考文献,参见D.Lane,Antibodies:A Laboratory Manual第2版(Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor NY,2013);Kohler和Milstein,(1976) Eur.J.Immunol.6:511;Queen等人,美国专利号5,585,089;Riechmann等人,Nature 332:323(1988);Bird,Science242:423-42(1988);Tomlinson I.和Holliger P.(2000)Methods Enzymol,326,461-479;Holliger P.(2005)Nat.Biotechnol.Sep;23(9):1126-36)。

[0053] 本领域技术人员将认识到与本文所述的方法和材料相似或等同的许多方法和材料,其可用于实践本发明。实际上,本发明决不限于所描述的方法和材料。出于本发明的目的,以下术语定义如下。

[0054] 如本文所用的“生物样品”的非限制性实例是指可从其获得核酸和/或蛋白质的任何生物材料。作为非限制性实例,该术语包括全血、外周血、血浆、血清、唾液、粘液、尿液、精液、淋巴液、粪便提取物、脸颊拭子、细胞或其他体液或组织,该组织包括但不限于通过手术活检或手术切除获得的组织。或者,可以通过原始患者衍生的细胞系,或以保藏样品或新鲜冷冻样品形式存档的患者样品获得样品。

[0055] 如本文所用的“治疗”是指治疗性治疗和预防或预防性措施,其目的在于预防或减缓(减轻)目标病理情况、预防病理情况、追求或获得良好的总体生存或者即使治疗最终不成功也降低个体发生病况的可能性。需要治疗的受试者包括已经患有病况的受试者,以及易患有该病况的受试者或者待预防该病况的受试者。

[0056] 如本文所用的“SNP”是指单核苷酸多态性。

[0057] 如本文所用的“风险变体”是指相对于不具有风险变体的个体,其存在与炎性肠病的易感性增加相关的等位基因,该炎性肠病包括但不限于克罗恩病、溃疡性结肠炎和医学难治性溃疡性结肠炎。

[0058] 如本文所用的“IBD”、“CD”、“UC”和“MR-UC”分别指炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎和医学难治性溃疡性结肠炎。

[0059] 如本文所用,“IBD”包括“CD”、“UC”和/或“MR-UC”。

[0060] 如本文所用,“ANCA”意指抗嗜中性粒细胞胞质抗体。

[0061] 如本文所用,“OmpC”意指外膜蛋白C。

[0062] 如本文所用,“eQTL”意指表达数量性状基因座。

[0063] 如本文所用,“mQTL”意指甲基化数量性状基因座。

[0064] RNASET2 SNP的非限制性实例为rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295和rs9366093。

[0065] 本文描述了使用RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 作为患者群体中疾病严重程度的生物

标志物并选择该患者群体进行抗TL1A疗法来诊断炎性肠病的方法。进一步描述了治疗这些患者群体的方法。

[0066] RNASET2(核糖核酸酶T2) 编码细胞外RNA酶,并且是人Rh/T2/S酸核糖核酸酶(酸水解)家族的唯一成员,其仅在酸性pH下有活性。RNASET2在pH 5下有最佳活性,并且优先切割多聚A和多聚U。其含有两个具有催化功能的区域,并在腺苷酸后紧接鸟苷酸附近表现出切割偏好。已经检测到RNASET2的三种同种型,即27KD、31KD和36KD同种型。27KD同种型和31KD同种型被认为是由36KD同种型的蛋白水解切割引起的。所有三种同种型都是糖基化的。亚细胞分级揭示,全长RNASET2位于内质网中,而两个较小的RNASET2蛋白水解产物位于溶酶体部分中。RNASET2在门之间(从病毒到人)是高度保守的,表明具有重要的进化功能。

[0067] TL1A(TNFSF15) 是肿瘤坏死因子家族成员,在免疫复合物刺激后或通过肠道微生物相互作用主要在免疫系统的活化细胞上表达,该细胞诸如单核细胞、巨噬细胞和树突细胞。TL1A表达在炎性肠病中增强,且较高的TL1A水平与疾病严重程度相关。全基因组关联研究(GWAS)已经鉴别TNFSF15 SNP与IBD相关。研究已经显示,中和TL1A抗体减弱鼠结肠炎模型中的结肠炎,而组成型TL1A表达则表明恶化的鼠回盲肠炎症和肠纤维狭窄。

[0068] IFN- γ 在IBD的粘膜炎症的产生和持续中起关键作用。TL1A增加PB T细胞中IL-12/IL-18介导的IFN- γ 分泌。

[0069] 发明人将RNASET2(一种IBS易感基因) 鉴别为TL1A介导的IFN- γ 产生增强的组分。此外,RNASET2的功能变体与更“严重”的CD表型相关,该CD表型特征在于一次或多次疾病发作和狭窄性/穿透性疾病行为。不受任何特定理论约束,发明人认为RNASET2充当与严重疾病病理学相关的治疗性生物标志物,并且允许鉴别最有可能受益于靶向TL1A驱动的炎性途径的疗法的患者群体。TNFSF15疾病相关变体与TL1A增加和持续的表达相关。TNFSF15已在GWAS中被鉴别和确认为IBD相关基因,并且被认为在调节肠炎症的位置和严重程度以及狭窄性疾病的发展中发挥作用。具有TL1A组成型表达的转基因小鼠发生伴随回肠和结肠纤维化的肠炎症,该肠炎症通过抗TL1A治疗逆转。在UC中,医学难治性疾病的发展与TL1A基因座之间存在很强的关联。尽管TL1A是与IBD发病机制相关的重要促炎性细胞因子,但对增强的细胞因子分泌和炎症的潜在分子途径知之甚少。如本文所述,发明人研究了在T细胞中诱导细胞因子表达(特别是IFN- γ) 的TL1A依赖性分子触发物。该方法将RNASET2的下调鉴别为TL1A介导的IFN- γ 产生增强的组分。

[0070] 发明人证明了RNASET2疾病风险SNP与从CD患者分离的T细胞中的表达和超甲基化降低的功能性关联,以及与提示复杂/耐药性疾病行为和疾病快速复发的临床参数的功能性关联。发明人示出了ETS TF在调节RNASET2表达中的调控潜力和经由ICAM1的同型T细胞聚集作为RNASET2介导的IFN- γ 产生上调的组分的参与。该数据将RNASET2辨别为潜在的治疗生物标志物,并鉴别在确定的IBD群体内进行额外治疗调节的独特途径。

[0071] 发明人发现,在IBD患者中,RNASET2与TNFSF15的表达之间存在显著的逆相关。此外,发明人证明了DNA超甲基化与RNASET2表达降低之间的功能性关联。

[0072] 发明人发现,在从外周T细胞和小肠手术切除分离的样品中,通过GWAS鉴别的RNASET2 IBD风险等位基因存在显著的eQTL重叠。在测量整个胸腺组织样品中的自身免疫相关风险变体的最近报道中,已经描述了显著的RNASET2 eQTL(rs429083)。该SNP也示出了数据中最显著的eQTL。此外,该研究提供了表明CD患者中RNASET2的表达水平降低与表示复

杂和耐药性疾病的临床参数相关的临床相关证据。值得注意的是,携带RNASET2疾病风险SNP的CD患者显示出狭窄性/穿透性疾病行为的发展增加。从每年表现出一次或多次疾病发作的CD患者分离的T细胞中的RNASET2表达显著较低。类似地,RNASET2表达在来自需要手术干预以进行疾病管理的医学难治的CD患者(11名患者中有9名对抗TNF疗法无应答)的小肠粘膜样品中以及外周样品中降低。与该发现一致,一项最近的研究报道了来自对抗TNF疗法耐药的患者的全血中显著的RNASET2 eQTL。此外,RNASET2疾病相关SNP与抗TNF疗法的治疗失败以及总体疾病严重程度的临床特征为肠切除>40cm相关。在有多次切除史的患者中,RNASET2疾病风险SNP与更快的再次手术时间相关。同样,RNASET2疾病相关SNP与患者中的内镜检查复发相关,该复发特征在于更严重(>2)的Rutgeerts评分,不受任何特定理论约束,该Rutgeerts评分可预测早期临床复发和再次手术的需要。

[0073] 调节RNASET2表达的转录调控区和结合因子同样未充分确定。通过GWAS鉴别的大多数疾病相关变体位于对应于启动子或增强子序列的调控性非编码区内。不受任何特定理论约束,研究表明经由破坏转录因子结合位点改变转录调控可能在疾病过程中起作用。在本研究中,发明人利用TF基序分析对显示eQTL和mQTL的大量变体进行优先级排序并鉴别出预期的调控性SNP。与SNP相关的rs2149092疾病改变了保守的ETS共有结合序列,并可能破坏包括IRF4、SPI1和ELF1在内的多个重叠TF结合位点的结合。此外,RNASET2表达水平与ETS和JUN TF家族成员之间存在较强的正相关。有趣的是,IRF4、SPI1和ELF1已被证明与T细胞发育相关,而GWAS已将IRF4和ELF1与IBD联系起来。不受任何特定理论约束,这些数据支持rs2049092作为TF-DNA相互作用调节物的功能性作用,并为确定TL1A减弱疾病中RNASET2表达的机制途径的未来研究奠定了基础。

[0074] 在本研究中,发明人描述了RNASET2与细胞黏附分子ICAM1之间的功能关系。IFN- γ 分泌响应于TL1A的增强一方面伴随着RNASET2表达的降低,而另一方面伴随着ICAM1水平的升高。通过Ab阻断ICAM1-LFA1相互作用抑制TL1A介导的IFN- γ 分泌。尽管ICAM1-LFA1接合传统上定义为在内皮细胞与T细胞之间发生,但最近这些相互作用已经显示在介导活化T细胞的同型细胞聚集中起关键作用。同型T-T聚集体已经显示促进IFN- γ 和IL2从一个T细胞到另一个T细胞的基于突触的细胞因子递送,从而导致IL-2受体连接和随后的STAT5磷酸化。发明人证明,增强的细胞聚集是产生IFN- γ 的细胞的标志,并且TL1A刺激增加了细胞聚集体的数目和大小。不受任何特定理论约束,这些发现表明RNASET2可通过整联蛋白信号传导途径发挥作用以调节下游IFN- γ 分泌。

[0075] 总之,发明人鉴别了两种IBD易感基因TNFSF15与RNASET2之间新颖的功能性关系和生物关系。发明人提供的证据表明,降低的RNASET2表达在功能上与TL1A驱动的活化T细胞的促炎性细胞因子产生相关,并在功能上与RNASET2 IBD易感性变体相关。同样,本研究证明了RNASET2表达降低与更严重形式的IBD炎症之间的关联,不希望受任何特定理论约束,我们认为该关联是通过TL1A介导的途径触发的疾病病理学的基础。RNASET2的降低表达和表观遗传DNA甲基化改变是具有更严重疾病表型的IBD患者的亚组的特征。发明人证明了RNASET2疾病风险SNP与从CD患者分离的T细胞中的表达和超甲基化降低的功能性关联,以及与指示复杂/耐药性疾病行为和疾病快速复发的临床参数的关联。发明人示出了ETS TF在调节RNASET2表达中的调控潜力以及经由ICAM1的同型T细胞聚集作为RNASET2介导的IFN- γ 产生上调的组分的参与。该数据将RNASET2辨别为潜在的治疗生物标志物,并鉴别在

确定的IBD群体内进行额外治疗调节的独特途径。因此,RNASET2表达充当鉴别不应答当前治疗策略的患者群体的更严重形式的炎症的新颖疾病生物标志物,该患者群体可受益于替代的RNASET2介导的治疗途径。

[0076] 如本文所公开的,发明人已鉴别了IBD患者队列中的RNASET2相关SNP。发明人已鉴别了CD患者队列中的RNASET2相关SNP。发明人已鉴别了UC患者队列中的RNASET2相关SNP。发明人已鉴别了MR-UC患者队列中的RNASET2相关SNP。SNP与疾病位置、疾病行为和手术需求相关。发明人已进一步将RNASET2鉴别为IBD患者队列中疾病严重程度和相关RNASET2风险SNP的生物标志物。RNASET2已被鉴别为CD患者队列中疾病严重程度和相关RNASET2风险SNP的生物标志物。RNASET2已被鉴别为UC患者队列中疾病严重程度和相关RNASET2风险SNP的生物标志物。RNASET2已被鉴别为MR-UC患者队列中疾病严重程度和相关RNASET2风险SNP的生物标志物。此外,发明人证明了RNASET2、TL1A表达和IFN- γ 分泌之间的相关性。

[0077] 本发明至少部分基于这些发现。本发明使用RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 解决了本领域对诊断IBD患者和鉴别需要治疗的患者的方法的需要。本发明进一步提供了用于患者鉴别和/或分层的方法。

[0078] 诊断

[0079] 本发明的各个实施方案提供了诊断受试者中的炎性肠病(IBD)的方法,其包括:从受试者获得样品;使样品经受适于确定RNASET2基因处的一种或多种风险变体是否存在的测定;以及基于RNASET2基因处存在一种或多种风险变体来诊断所述受试者中的IBD。在一些实施方案中,炎性肠病为克罗恩病、溃疡性结肠炎或医学难治性溃疡性结肠炎。在各个实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体为rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295或rs9366093。在各个实施方案中,如果存在如本文所述的2种、3种、4种、5种或6种RNASET2风险变体,则受试者被诊断患有IBD。在各个实施方案中,rs2149085的风险等位基因为T等位基因。在各个其他实施方案中,RNASET2风险变体为RNASET2风险变体rs429083,以及选自rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295、rs9366093及其组合的RNASET2风险变体。在各个其他实施方案中,RNASET2风险变体为表2、表3、表4、表5、表6、表7、表8、表9、表10和表13中的一种或多种RNASET2风险变体,以及选自rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295、rs9366093及其组合的RNASET2风险变体。在各个其他实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体为rs1819333、rs2149092、rs9355610或rs2149085。在各个实施方案中,如果存在如本文所述的2种、3种或4种RNASET2风险变体rs1819333、rs2149092、rs9355610或rs2149085,则受试者被诊断患有IBD。在其他实施方案中,样品中存在更大数目的风险变体表明受试者更需要治疗。在一些实施方案中,RNASET2风险变体的检测指示受试者需要治疗。在其他实施方案中,受试者被鉴别为需要抗TL1A疗法。在各个实施方案中,被诊断患有IBD的受试者表现出巯基嘌呤和抗TNF疗法的治疗失败。在各个其他实施方案中,被诊断患有IBD的受试者确定需要手术干预。在一些实施方案中,手术干预为肠切除。

[0080] 表1:RNASET2风险变体

[0081]

SNP	SEQ ID NO:
rs1819333	1
rs2149092	2

rs9355610	3
rs2149085	4
rs1410295	5
rs9366093	6

[0082] 在其他实施方案中,诊断本文所述的受试者中的炎性肠病(IBM)的方法包括确定RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的表达水平。在一些实施方案中,RNASET2水平降低和/或TL1A水平升高和/或IFN- γ 水平升高的受试者被诊断患有IBM。在各个实施方案中,炎性肠病为克罗恩病。在各个实施方案中,炎性肠病为溃疡性结肠炎。在各个实施方案中,炎性肠病为医学难治性溃疡性结肠炎。在各个实施方案中,炎性肠病为需要手术干预以进行疾病管理的CD患者。在其他实施方案中,RNASET2水平降低和/或TL1A水平升高和/或IFN- γ 水平升高的受试者被鉴别为需要增加RNASET2和/或减少TL1A和/或减少IFN- γ 的治疗的受试者。在其他实施方案中,受试者被鉴别为需要抗TL1A疗法。在其他实施方案中,受试者被鉴别为需要引起RNASET2增加的治疗。在某些其他实施方案中,受试者被鉴别为需要引起IFN- γ 和/或TL1A减少的治疗。

[0083] 在各个实施方案中,RNASET2风险变体以及/或者RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 表达水平的检测可通过分析来自受试者的生物样品的核酸来完成。可使用各种装置和/或方法检测RNASET2风险变体,包括但不限于基于聚合酶链反应的分析、序列分析和电泳分析。可使用各种装置和/或方法检测RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的表达水平,包括但不限于定量PCR、RNA印迹和微阵列。如本文所用,术语“核酸”意指多核苷酸,诸如单链或双链DNA或RNA分子,包括例如基因组DNA、cDNA和mRNA。术语核酸包括天然和合成来源的核酸分子,以及代表天然核酸分子的有义链或反义链或两者的线性、环状或分支构型的分子。

[0084] 在各个其他实施方案中,确定RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的表达水平可通过分析来自受试者的生物样品的蛋白质来完成。可使用各种装置和/或方法检测RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 表达水平,包括但不限于ELISA、免疫组织化学和蛋白质印迹。

[0085] 本发明的各个实施方案还提供了诊断医学难治性溃疡性结肠炎(MR-UC)的方法,其包括:从受试者获得样品;使样品经受适于确定RNASET2处的一种或多种风险变体是否存在的测定;以及基于RNASET2基因处存在一种或多种风险变体来诊断所述受试者中的MR-UC。在各个实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体为rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295或rs9366093。在各个实施方案中,rs2149085的风险等位基因为T等位基因。在各个其他实施方案中,RNASET2风险变体为RNASET2风险变体rs429083,以及选自rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295、rs9366093及其组合的RNASET2风险变体。在各个其他实施方案中,RNASET2风险变体为表2、表3、表4、表5、表6、表7、表8、表9、表10和表13中的一种或多种RNASET2风险变体,以及选自rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295、rs9366093及其组合的RNASET2风险变体。在各个其他实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体为rs1819333、rs2149092、rs9355610或rs2149085。在各个实施方案中,如果存在如本文所述的2种、3种或4种RNASET2风险变体rs1819333、rs2149092、rs9355610或rs2149085,则受试者被诊断患有IBM。

[0086] 在各个实施方案中,被诊断患有MR-UC的受试者表现出巯基嘌呤和抗TNF疗法的治

疗失败。在各个其他实施方案中,被诊断患有MR-UC的受试者确定需要手术干预。在一些实施方案中,手术干预为肠切除。在各个实施方案中,被诊断患有MR-UC的受试者确定需要RNASET2介导的疗法,诸如但不限于重组RNASET2和抗ICAM1。在各个实施方案中,RNASET2介导的疗法为靶向RNASET2上游和/或下游基因的抗体或小分子。

[0087] 在各个其他实施方案中,该方法进一步包括确定RNASET2的甲基化水平,以及诊断患有RNASET2甲基化增加的受试者的IBD。在其他实施方案中,确定RNASET2甲基化水平以诊断患有MR-UC的受试者。在一些实施方案中,受试者被鉴别为需要引起RNASET2甲基化减少的治疗。在其他实施方案中,受试者被鉴别为需要抗TL1A疗法。

[0088] 本发明的各个实施方案提供了被诊断患有MR-UC的受试者的治疗。MR-UC受试者对使用的当前常规药物治疗是难治性的,该疗法诸如抗TNF疗法、巯基嘌呤疗法、皮质类固醇和环孢菌素。在各个实施方案中,用非常规治疗对诊断患有MR-UC的受试者进行治疗,该非常规治疗诸如但不限于模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗。在各个实施方案中,模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗可包含抗体和/或沉默寡核苷酸。在各个实施方案中,被诊断患有MR-UC的受试者确定需要RNASET2介导的疗法,诸如但不限于重组RNASET2和抗ICAM1。在各个实施方案中,RNASET2介导的疗法为靶向RNASET2上游和/或下游基因的抗体或小分子。

[0089] 在各个实施方案中,受试者被鉴别为需要模拟RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗。在其他实施方案中,受试者被鉴别为需要调节RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗。在一些其他实施方案中,受试者被鉴别为需要靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗。在其他实施方案中,受试者被鉴别为需要模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗。在各个实施方案中,模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗可包含抗体和/或沉默寡核苷酸。在各个实施方案中,该疾病为IBD。在各个实施方案中,该疾病为CD。在各个实施方案中,该疾病为UC。在各个实施方案中,该疾病为MR-UC。在各个实施方案中,被诊断的受试者为需要手术干预以进行疾病管理的CD患者。

[0090] 在各个实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体的存在与RNASET2的表达降低相关。在其他实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体的存在与外周组织和粘膜组织中RNASET2的表达降低相关。在一些其他实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体的存在与需要手术干预以进行疾病管理的患者中的DNA过度甲基化相关。在其他实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体的存在与巯基嘌呤和/或抗TNF疗法的治疗失败相关。在一些其他实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体的存在与ANCA血清阳性相关。在各个其他实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体的存在与肠切除的总长度增加相关。

[0091] 受试者鉴别和/或分层

[0092] 本发明的各个实施方案提供了鉴别患有炎性肠病的受试者进行治疗的方法,其包括:确定RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的表达水平;以及将需要治疗的受试者鉴别为具有降低的RNASET2水平和/或升高的TL1A水平和/或升高的IFN- γ 水平的受试者。在各个实施方案中,炎性肠病为克罗恩病。在各个实施方案中,炎性肠病为溃疡性结肠炎。在各个实施方案中,炎性肠病为医学难治性溃疡性结肠炎。在各个其他实施方案中,受试者被鉴别为需要引起RNASET2增加的治疗。在其他实施方案中,受试者被鉴别为需要引起TL1A和/或IFN- γ 减

少的治疗。在某些实施方案中,受试者被鉴别为需要抗TL1A疗法。在一些实施方案中,受试者被鉴别为需要模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗。在各个实施方案中,模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗包含抗体和/或沉默寡核苷酸。

[0093] 如本文所用的“患者风险分层”意指将受试者分成需要治疗的风险组的过程。

[0094] 本发明的各个实施方案提供了患者风险分层的方法,以相对于健康个体鉴别需要治疗的受试者。在各个实施方案中,基于来自受试者的生物样品中RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的检测对受试者进行分层。在一些实施方案中,RNASET2的减少指示患者患有IBD,需要治疗。在一些实施方案中,RNASET2的减少指示患者患有CD需要治疗。在一些实施方案中,患者为需要手术干预以进行疾病管理的CD患者。在一些实施方案中,RNASET2的减少指示患者患有UC,需要治疗。在一些实施方案中,RNASET2的减少指示患者患有MR-UC,需要治疗。在各个其他实施方案中,TL1A和/或IFN- γ 的增加指示患者患有IBD,需要治疗。在各个其他实施方案中,TL1A和/或IFN- γ 的增加指示患者患有CD,需要治疗。在各个其他实施方案中,TL1A和/或IFN- γ 的增加指示患者患有UC,需要治疗。在各个其他实施方案中,TL1A和/或IFN- γ 的增加指示患者患有MR-UC,需要治疗。在某些其他实施方案中,RNASET2的减少、TL1A的增加和IFN- γ 的增加指示受试者患有IBD,需要治疗。在某些其他实施方案中,RNASET2的减少、TL1A的增加和IFN- γ 的增加指示受试者患有CD,需要治疗。在某些其他实施方案中,RNASET2的减少、TL1A的增加和IFN- γ 的增加指示受试者患有UC,需要治疗。在某些其他实施方案中,RNASET2的减少、TL1A的增加和IFN- γ 的增加指示受试者患有MR-UC,需要治疗。在各个实施方案中,基因的检测为受试者的治疗提供指导。在某些实施方案中,受试者被鉴别为需要模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗。在各个实施方案中,模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗可包含抗体和/或沉默寡核苷酸。在各个其他实施方案中,鉴别需要治疗的受试者的患者风险分层方法是相对于先前已进行过治疗的健康个体。在各个其他实施方案中,鉴别需要治疗的受试者的患者风险分层方法是相对于医学上有应答的个体。

[0095] 本发明的各个实施方案提供了被诊断患有MR-UC的受试者的治疗。MR-UC受试者对使用的当前常规药物疗法是难治性的,该疗法诸如抗TNF疗法、巯基嘌呤疗法、皮质类固醇和环孢菌素。在各个实施方案中,用非常规治疗对诊断患有MR-UC的受试者进行治疗,该非常规治疗诸如但不限于模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗。在各个实施方案中,模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗可包含抗体和/或沉默寡核苷酸。在各个实施方案中,被诊断患有MR-UC的受试者确定需要RNASET2介导的疗法,诸如但不限于重组RNASET2和抗ICAM1。在各个实施方案中,RNASET2介导的疗法为靶向RNASET2上游和/或下游基因的抗体或小分子。

[0096] 在其他实施方案中,本文描述的用于受试者鉴别和/或分层的方法包括确定一种或多种风险变体的存在。在某些实施方案中,一种或多种风险变体包括rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295或rs9366093。在各个实施方案中,如果存在如本文所述的2种、3种、4种、5种或6种RNASET2风险变体,则该方法包括鉴别受试者患有IBD需要治疗。在各个实施方案中,rs2149085的风险等位基因为T等位基因。在各个其他实施方案中,RNASET2风险变体为RNASET2风险变体rs429083,以及选自rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295、rs9366093及其组合的RNASET2风险变体。在各个其他实

施方案中,RNASET2风险变体为表2、表3、表4、表5、表6、表7、表8、表9、表10和表13中的一种或多种RNASET2风险变体,以及选自rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295、rs9366093及其组合的RNASET2风险变体。在各个其他实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体为rs1819333、rs2149092、rs9355610或rs2149085。在各个实施方案中,如果存在如本文所述的2种、3种或4种RNASET2风险变体rs1819333、rs2149092、rs9355610或rs2149085,则受试者被诊断患有IBD。在各个其他实施方案中,生物样品中风险变体的检测将受试者分层为需要治疗的组。在其他实施方案中,样品中存在更大数目的风险变体表明受试者更需要治疗。在一些实施方案中,RNASET2风险变体的检测指示受试者需要治疗。在一些实施方案中,受试者被鉴别为需要抗TL1A疗法。在各个实施方案中,受试者被鉴别为需要RNASET2介导的疗法,诸如但不限于重组RNASET2和抗ICAM1。在各个实施方案中,RNASET2介导的疗法为靶向RNASET2上游和/或下游基因的抗体或小分子。

[0097] 在各个实施方案中,如本文所讨论的,RNASET2风险变体的检测可通过分析来自受试者的生物样品的核酸来完成。

[0098] 在其他实施方案中,本文所述的用于受试者鉴别和/或受分层的方法进一步包括测定样品以检测相对于健康个体的RNASET2甲基化水平。在一些实施方案中,具有升高的RNASET2甲基化水平的受试者被鉴别为需要治疗的受试者。在一些实施方案中,评估样品的RNASET2甲基化水平以及一种或多种RNASET2风险变体。在某些实施方案中,RNASET2甲基化增加以及存在一种或多种RNASET2风险变体的受试者被鉴别为需要治疗的受试者。在其他实施方案中,评估样品的RNASET2甲基化水平以及RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的表达水平。在某些实施方案中,RNASET2甲基化增加以及RNASET2减少、TL1A和/或IFN- γ 增加的受试者被鉴别为需要治疗的受试者。在某些实施方案中,受试者被鉴别为需要模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗。在各个实施方案中,模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗可包含抗体和/或沉默寡核苷酸。在一些实施方案中,受试者被鉴别为需要抗TL1A疗法。在一些实施方案中,受试者被鉴别为需要引起RNASET2甲基化减少的治疗。在各个其他实施方案中,RNASET2甲基化增加的检测指示患有严重CD的需要手术的患者。在进一步的实施方案中,受试者被鉴别为需要包括结肠切除和/或抗TL1A疗法的治疗。

[0099] 在各个其他实施方案中,本文所述的用于受试者鉴别和/或分层的方法可进一步包括测定样品以检测相对于健康个体的至少一种微生物抗原(血清学因子)的增加或减少。在一些实施方案中,评估的微生物抗原(血清学因子)包括ANCA、ASCA、OmpC、I2和CBir。在一些实施方案中,评估样品的一种或多种微生物抗原(血清学因子)和一种或多种RNASET2风险变体。在某些实施方案中,具有一种或多种风险血清学因子并且存在一种或多种RNASET2风险变体的受试者被鉴别为需要治疗的受试者。在其他实施方案中,评估样品的一种或多种风险血清学因子以及RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的表达水平。在某些实施方案中,具有一种或多种风险血清学因子以及RNASET2减少、TL1A和/或IFN- γ 增加的受试者被鉴别为需要治疗的受试者。在一些实施方案中,受试者被鉴别为需要模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗。在各个实施方案中,模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗可包含抗体和/或沉默寡核苷酸。在其他实施方案中,该治疗为抗TL1A疗法。在各个实施方案中,该治疗为RNASET2介导的疗法,诸如但不限于重组RNASET2和抗ICAM1。在各个实施方案中,RNASET2介导的疗法为靶向RNASET2上游和/或下游基因的抗体或小分

子。

[0100] 在各个实施方案中,被鉴别患有IBD的受试者表现出巯基嘌呤和抗TNF疗法的治疗失败。在各个其他实施方案中,被鉴别患有IBD的受试者确定需要手术干预。在一些其他实施方案中,手术干预为肠切除。本发明的各个实施方案还提供了为患有炎性肠病的受试者选择手术的方法,其包括:从受试者获得样品;使样品经受适于确定RNASET2基因处的一种或多种风险变体是否存在的测定;基于RNASET2基因处存在一种或多种风险变体来诊断受试者中的MR-UC;以及为被诊断患有MR-UC的受试者选择手术。在一些实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体为rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295或rs9366093。在各个其他实施方案中,RNASET2风险变体为RNASET2风险变体rs429083,以及选自rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295、rs9366093及其组合的RNASET2风险变体。在各个其他实施方案中,RNASET2风险变体为表2、表3、表4、表5、表6、表7、表8、表9、表10和表13中的一种或多种RNASET2风险变体,以及选自rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295、rs9366093及其组合的RNASET2风险变体。在各个其他实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体为rs1819333、rs2149092、rs9355610或rs2149085。在各个实施方案中,如果存在如本文所述的2种、3种或4种RNASET2风险变体rs1819333、rs2149092、rs9355610或rs2149085,则受试者被诊断患有IBD。在一些实施方案中,该方法进一步包括确定RNASET2的甲基化水平。在各个实施方案中,RNASET2甲基化水平提高的受试者被鉴别为需要手术的受试者。在其他实施方案中,RNASET2甲基化增加以及RNASET2基因处存在一种或多种风险变体的受试者被鉴别为需要手术的受试者。

[0101] 在各个实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体的存在与RNASET2的表达降低相关。在其他实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体的存在与外周组织和粘膜组织中RNASET2的表达降低相关。在一些其他实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体的存在与需要手术干预以进行疾病管理的患者中的DNA过度甲基化相关。在其他实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体的存在与巯基嘌呤和/或抗TNF疗法的治疗失败相关。在一些其他实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体的存在与ANCA血清阳性相关。在各个其他实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体的存在与肠切除的总长度增加相关。

[0102] 本发明的各个实施方案提供了为患有炎性肠病的受试者选择疗法的方法,其包括:从受试者获得样品;使样品经受适于确定RNASET2基因处的一种或多种风险变体是否存在的测定;基于RNASET2基因处存在一种或多种风险变体来诊断受试者中的医学难治性溃疡性结肠炎(MR-UC);以及针对诊断患有MR-UC的受试者选择手术作为疗法而不选择巯基嘌呤或抗TNF作为疗法。在各个实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体为rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295或rs9366093。在各个其他实施方案中,RNASET2风险变体为RNASET2风险变体rs429083,以及选自rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295、rs9366093及其组合的RNASET2风险变体。在各个其他实施方案中,RNASET2风险变体为表2、表3、表4、表5、表6、表7、表8、表9、表10和表13中的一种或多种RNASET2风险变体,以及选自rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295、rs9366093及其组合的RNASET2风险变体。在各个其他实施方案中,RNASET2基因处的一种或多种风险变体为rs1819333、rs2149092、rs9355610或rs2149085。在各个实施方

案中,如果存在如本文所述的2种、3种或4种RNASET2风险变体rs1819333、rs2149092、rs9355610或rs2149085,则受试者被诊断患有IBD。在其他实施方案中,该方法进一步包括确定RNASET2的甲基化水平,其中增加的甲基化指示受试者需要手术干预。

[0103] 本发明的各个实施方案提供了被诊断患有MR-UC的受试者的治疗。MR-UC受试者对使用的当前常规药物治疗是难治性的,该疗法诸如抗TNF疗法、巯基嘌呤疗法、皮质类固醇和环孢菌素。在各个实施方案中,用非常规治疗对诊断患有MR-UC的受试者进行治疗,该非常规治疗诸如但不限于模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗。在各个实施方案中,模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗可包含抗体和/或沉默寡核苷酸。在各个实施方案中,被诊断患有MR-UC的受试者确定需要RNASET2介导的疗法,诸如但不限于重组RNASET2和抗ICAM1。在各个实施方案中,RNASET2介导的疗法为靶向RNASET2上游和/或下游基因的抗体或小分子。

[0104] 甲基化的检测

[0105] 各个实施方案提供了诊断患有炎性肠病 (IBD) 的受试者的方法。在一些实施方案中,该方法包括确定RNASET2的甲基化水平;以及将IBD患者鉴别为具有增加的RNASET2甲基化的受试者。在其他实施方案中,该方法包括将患有IBD的受试者鉴别为具有增加的RNASET2甲基化的受试者以及具有RNASET2基因处的一种或多种风险变体的存在的受试者。在各个其他实施方案中,该方法包括确定RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的表达水平;以及如果受试者具有RNASET2减少、TL1A增加、IFN- γ 增加和/或RNASET2甲基化增加,则诊断受试者患有IBD的。

[0106] 各个实施方案提供了鉴别患有炎性肠病 (IBD) 的需要治疗的受试者的方法。在一些实施方案中,该方法包括确定RNASET2的甲基化水平;以及将需要治疗的受试者鉴别为具有增加的RNASET2甲基化的受试者。在其他实施方案中,确定RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的表达水平以及RNASET2的甲基化水平,以鉴别患有炎性肠病的需要治疗的受试者。在各个实施方案中,该方法包括将需要治疗的受试者确定为具有RNASET2减少、TL1A增加、IFN- γ 增加和/或RNASET2甲基化增加的受试者。在各个其他实施方案中,该方法包括确定RNASET2基因处的一种或多种风险变体是否存在,并将患有IBD的需要治疗的受试者鉴别为具有RNASET2甲基化增加以及存在一种或多种RNASET2风险变体的受试者。

[0107] 在各个实施方案中,甲基化的增加指示受试者需要手术干预。在其他实施方案中,RNASET2甲基化的增加指示需要手术干预。

[0108] 检测甲基化水平的各种方法包括但不限于以下测定,质谱、甲基化特异性PCR (MSP)、全基因组亚硫酸氢盐测序 (BS-Seq)、HELP测定、ChIP-on-chip测定、限制性标志基因组扫描、甲基化DNA免疫沉淀 (MeDIP、MeDIP-chip、MeDIPseq)、亚硫酸氢盐处理DNA的焦磷酸测序、DNA腺嘌呤甲基转移酶活性的分子断裂光测定、甲基敏感的DNA印迹、使用MethylCpG结合蛋白 (MBP) 和/或甲基结合域 (MBD) 将天然DNA分离成甲基化和未甲基化的级分、甲基化EPIC微珠芯片、Illumina Infinium甲基化450微珠芯片、高分辨率溶解分析 (HRM或HRMA) 和/或古DNA甲基化重建。

[0109] 本发明的各个实施方案提供了通过以下方法对诊断患有炎性肠病 (IBD) 的受试者的治疗,该方法包括:从受试者获得样品;使样品经受适于确定RNASET2基因处的一种或多种风险变体是否存在的测定;以及基于RNASET2基因处存在一种或多种风险变体来诊断受

试者中的IBD。在各个实施方案中,炎性肠病为克罗恩病、溃疡性结肠炎或医学难治性溃疡性结肠炎。

[0110] 本发明的各个实施方案提供了通过以下方法对诊断患有医学难治性溃疡性结肠炎(MR-UC)的受试者的治疗,该方法包括:从受试者获得样品;使样品经受适于确定RNASET2基因处的一种或多种风险变体是否存在的测定;以及基于RNASET2处存在一种或多种风险变体来诊断受试者中的MR-UC。

[0111] 本发明的各个实施方案提供了被诊断患有MR-UC的受试者的治疗。MR-UC受试者对使用的当前常规药物疗法是难治性的,该疗法诸如抗TNF疗法和巯基嘌呤疗法。在各个实施方案中,用非常规治疗对诊断患有MR-UC的受试者进行治疗,该非常规治疗诸如但不限于模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗。在各个实施方案中,模拟、调节和/或靶向RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的治疗可包含抗体和/或沉默寡核苷酸。在各个实施方案中,被诊断患有MR-UC的受试者确定需要RNASET2介导的疗法,诸如但不限于重组RNASET2和抗ICAM1。在各个实施方案中,RNASET2介导的疗法为靶向RNASET2上游和/或下游基因的抗体或小分子。

[0112] 生物样品、样品制备和基因表达检测

[0113] 在各个实施方案中,本发明涉及的步骤包括从受试者获得生物样品。可通过手术活检或手术切除来获得生物样品。或者,可通过原始患者衍生的细胞系,或者以FFPE(福尔马林固定,石蜡包埋)样品或新鲜冷冻样品形式存档的患者样品获得样品。样品还可包括全血、外周血、血浆、血清、唾液、脸颊拭子或其他体液或组织。在各个实施方案中,样品包括来自大肠和/或小肠的组织。在各个其他实施方案中,大肠样品包括盲肠、结肠(升结肠、横结肠、降结肠和乙状结肠)、直肠和/或肛管。在其他实施方案中,小肠样品包括十二指肠、空肠和/或回肠。

[0114] 可通过本领域公知的手段制备可用于本发明方法中的衍生自受试者的生物样品(即组织和/或细胞)的核酸样品或蛋白质样品。例如,手术程序或针吸活检可用于从受试者收集生物样品。在一些实施方案中,富集和/或纯化来自正常组织和/或细胞样品的异常组织和/或细胞样品很重要。在其他实施方案中,然后可以在提取基因组核酸或前RNA用于本发明方法之前显微切割该异常组织和/或细胞样品以减少正常组织污染的量。这样的富集和/或纯化可根据本领域公知的方法完成,诸如针显微切割、激光显微切割、荧光激活细胞分选和免疫细胞分选。

[0115] 可使用各种技术中的任一种对来自个体的核酸和/或蛋白质进行分析。在各个实施方案中,测定RNASET2的基因表达水平包括RNA印迹、逆转录PCR、实时PCR、基因表达的系列分析(SAGE)、DNA微阵列、瓦片阵列、RNA-Seq或其组合。在各个其他实施方案中,测定RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的基因表达水平。在其他实施方案中,确定RNASET2甲基化的水平。

[0116] 在各个实施方案中,检测蛋白质表达的方法和系统包括但不限于ELISA、免疫组织化学、蛋白质印迹、流式细胞术、荧光原位杂交(FISH)、放射免疫测定和亲和纯化。

[0117] 基因表达水平的分析可涉及通过聚合酶链反应扩增个体的核酸。使用聚合酶链反应扩增核酸是本领域公知的(参见例如,Mullis等人(Eds.),The Polymerase Chain Reaction,Birkhauser,Boston,(1994))。

[0118] “定量”扩增的方法是本领域技术人员公知的。例如,定量PCR涉及使用相同的引物同时共扩增已知量的对照序列。这提供了可用于校准PCR反应的内标。定量PCR的详细方案提供于Innis,等人(1990)PCR Protocols,A Guide to Methods and Applications,Academic Press,Inc.N.Y.)。使用定量PCR分析对微卫星基因座处DNA拷贝数的测量描述于Ginzonger,等人(2000)Cancer Research 60:5405-5409。基因已知的核酸序列足以使本领域技术人员能够常规选择引物以扩增基因的任何部分。荧光定量PCR也可用于本发明的方法。在荧光定量PCR中,定量基于荧光信号(例如,TaqMan和sybr green)的量。

[0119] 其他合适的扩增方法包括但不限于,连接酶链反应(LCR)(参见Wu和Wallace(1989)Genomics 4:560;Landegren,等人(1988)Science241:1077;以及Barringer等人(1990)Gene 89:117)、转录扩增(Kwoh,等人(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173)、自动维持序列复制(Guatelli,等人(1990)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 87:1874)、斑点PCR和连接接头PCR等。

[0120] 可通过例如基因组DNA、基因组DNA片段、与接头序列或克隆序列连接的基因组DNA片段的聚合酶链反应(PCR)扩增来获得适合于杂交的DNA样品。本领域公知的计算机程序可用于设计具有所需特异性和最佳扩增性质的引物,诸如Oligo 5.0版(National Biosciences)。PCR方法是本领域公知的,并在例如Innis等人,eds.,1990,PCR Protocols:A Guide to Methods And Applications,Academic Press Inc.,San Diego,Calif中描述。对于本领域技术人员将显而易见的是,对于分离和扩增核酸,受控的机器人系统是有用的且可以使用。

[0121] 杂交

[0122] 衍生自受试者的本发明方法中使用的核酸样品可与包含探针(例如,寡核苷酸探针)的阵列杂交,以鉴别RNASET2、TL1A和/或IFN- γ ,并且在其中管家基因表达也待评估的情况下,该阵列包含探针以鉴别选定的管家基因。在特定实施方案中,本发明方法中使用的探针包含可以在DNA芯片上平铺的探针阵列(例如,SNP寡核苷酸探针)。选择本发明方法中使用的杂交和洗涤条件,使得待由本发明分析的核酸样品与阵列的互补寡核苷酸序列特异性结合或特异性杂交,优选与其互补DNA所处的特定阵列位点特异性结合或特异性杂交。在一些实施方案中,例如,如在Affymetrix寡核苷酸阵列中所使用的,互补DNA可完全匹配或在某种程度上错配。阵列的单链合成寡脱氧核糖核酸DNA探针可能需要在与来自受试者的核酸样品接触之前变性,例如,以去除由于自补序列而形成的发夹或二聚体。

[0123] 最佳杂交条件将取决于探针的长度和来自受试者的核酸样品的类型。核酸特异性(即严格)杂交条件的一般参数描述于Sambrook和Russel,Molecular Cloning:A Laboratory Manual第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press(Cold Spring Harbor,NY 2012);Ausubel等人,eds.,1989,Current Protocols in Molecules Biology,第1卷,Green Publishing Associates,Inc.,John Wiley&Sons,Inc.,New York,2.10.1-2.10.16页。示例性的有用杂交条件提供于例如Tijessen,1993,Hybridization with Nucleic Acid Probes,Elsevier Science Publishers B.V.和Kricka,1992,Nonisotopic DNA Probe Techniques,Academic Press,San Diego,Calif。

[0124] 寡核苷酸核酸阵列

[0125] 在本发明方法的一些实施方案中,DNA阵列可用于通过测量核酸序列与包含互补

序列的寡核苷酸探针的杂交水平来确定基因的表达水平。采用寡核苷酸“探针”(即具有确定序列的核酸分子)的DNA阵列的各种形式是本领域技术人员公知的。通常,其中每个核酸探针具有确定序列的一组核酸探针固定在固体支持物上,以这样的方式将每个不同的探针固定至预定区域。在某些实施方案中,该组探针在支持物上形成位置可寻址的结合(例如,杂交)位点的阵列。每个这样的结合位点包含与支持物上预定区域结合的探针的多个寡核苷酸分子。更具体地,该阵列的每个探针优选地位于固体支持物上已知的预定位置,使得可从其在阵列上(即,在支持物或表面上)的位置确定每个探针的身份(即,序列)。微阵列可以以多种方式制备,其中几种在本文中描述。无论如何产生,微阵列都共享某些特性,它们是可再现的,从而允许产生给定阵列的多个拷贝并且易于相互比较。

[0126] 在一些实施方案中,微阵列由在结合(例如,核酸杂交)条件下稳定的材料制成。微阵列优选较小,例如,约 1cm^2 至 25cm^2 ,优选约 1cm^2 至 3cm^2 。然而,还考虑到更大和更小的阵列,并且其对于例如同时评价极大量的不同探针可能是优选的。可直接在支持物上寡核苷酸探针合成以形成阵列。探针可附接至固体支持物或表面,该固体支持物或表面可由例如玻璃、塑料(例如聚丙烯、尼龙)、聚丙烯酰胺、硝化纤维素、凝胶或其他多孔或无孔材料制成。该组固定化探针或固定化探针阵列与含有标记核酸种类的样品接触,使得具有与固定化探针互补的序列的核酸与探针杂交或结合。在分离(例如,通过洗去)任何未结合的物质后,检测并测量结合的标记序列。测量通常在计算机辅助下进行。DNA阵列技术使得确定RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 、管家基因的表达水平和以及RNASET2的甲基化状态成为可能。

[0127] 在某些实施方案中,高密度寡核苷酸阵列用于本发明的方法中。这些包含数千个与位于表面上确定位置的确定序列互补的寡核苷酸的阵列可通过例如光刻技术在表面上原位合成(参见例如,Fodor等人,1991,Science 251:767-773;Pease等人,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.91:5022-5026;Lockhart等人,1996,Nature Biotechnology 14:1675;美国专利号5,578,832;5,556,752;5,510,270;5,445,934;5,744,305;以及6,040,138)。使用喷墨技术生成阵列用于原位寡核苷酸合成的方法也是本领域已知的(参见例如,Blanchard,International Patent Publication WO 98/41531,1998年9月24日公开;Blanchard等人,1996,Biosensors And Bioelectronics 11:687-690;Blanchard,1998,in Synthetic DNA Arrays in Genetic Engineering,第20卷,J.K.Setlow,Ed.,Plenum Press,New York111-123页)。将核酸附接至表面的另一种方法是通过在玻璃板上印刷,如Schena等人(1995,Science 270:467-470)大体所述。还可以使用其他用于制备微阵列的方法,例如通过掩膜(Maskos和Southern,1992,Nucl.Acids.Res.20:1679-1684)。当使用这些方法时,已知序列的寡核苷酸(例如,15至60聚体)直接在表面(诸如衍生化的载玻片)上合成。产生的阵列可以是丰余的,其中多个寡核苷酸分子对应于每个感兴趣的信息性基因座(例如,SNP、RFLP、STR等)。

[0128] 用于产生DNA阵列的寡核苷酸探针的一种示例性手段为通过合成多核苷酸或合成寡核苷酸的合成,例如使用N-磷酸盐或亚磷酰胺化学(Froehler等人,1986,Nucleic Acid Res.14:5399-5407;McBride等人,1983,Tetrahedron Lett.24:246-248)。合成序列的长度通常为约15至约600个碱基,更通常约20至约100个碱基,最优选长度为约40至约70个碱基。在一些实施方案中,合成核酸包括非天然碱基,诸如但决不限于肌昔。如上所述,核酸类似物可用作杂交的结合位点。合适的核酸类似物的实例为肽核酸(参见例如,Egholm等人,

1993, Nature 363:566-568; 美国专利号5,539,083)。在替代实施方案中,杂交位点(即,探针)由对应于SNP或其互补序列的基因组DNA区域的质粒或噬菌体克隆制成。用于本发明方法的寡核苷酸探针的大小可以是长度为至少10、20、25、30、35、40、45或50个核苷酸。本领域公知,虽然杂交对于互补序列具有选择性,但是不完全互补的其他序列也可在一些水平上与给定探针杂交。因此,可使用具有轻微变化的多个寡核苷酸探针,以优化样品的杂交。为了进一步优化杂交,可通过本领域公知的方法改变杂交严格条件,例如,杂交温度和盐浓度。

[0129] 在各个实施方案中,本发明方法中使用的高密度寡核苷酸阵列包含对应于RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 和管家基因的寡核苷酸。在其他实施方案中,寡核苷酸对应于甲基化的RNASET2。寡核苷酸探针可包含DNA或DNA“模拟物”(例如,衍生物和类似物),该DNA或DNA“模拟物”对应于受试者基因组中每个感兴趣的信息性基因座(例如,SNP、RFLP、STR等)的一部分。寡核苷酸探针可以在碱基部分、糖部分或磷酸骨架处被修饰。示例性DNA模拟物包括例如,硫代磷酸酯。对于每个SNP基因座,可使用与样品核酸序列互补的多个不同的寡核苷酸。例如,对于感兴趣的单个信息性基因座(例如,SNP、RFLP、STR等),可使用约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50种或更多种不同的寡核苷酸。针对感兴趣的特定信息性基因座的每种寡核苷酸可在SNP周围的完全匹配、错配和侧翼序列中具有轻微变化。在某些实施方案中,产生探针使得针对感兴趣的特定信息性基因座的探针包含重叠和/或连续的重叠序列,该重叠和/或连续的重叠序列跨越或平铺含有靶位点的基因组区域,其中所有探针都含有靶位点。举例而言,重叠的探针序列可以以预定碱基间隔的步长平铺,例如,以1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个碱基间隔的步长平铺。在某些实施方案中,可使用适合与分子倒置探针方案一起使用的阵列进行测定,如Wang等人(2007) Genome Biol. 8, R246所述。对于靶向非常相似(即同源)序列的核酸种类的寡核苷酸探针而言,类似探针之间的“交叉杂交”可显著污染和混淆杂交测量的结果。交叉杂交是SNP检测中特别重要的问题,因为待检测的序列(即,特定SNP)必须与仅有单个核苷酸不同的其他序列区分开。可通过调节杂交严格条件和/或在杂交后洗涤期间使交叉杂交最小化。高度严格的条件允许检测核苷酸序列的等位基因变体,例如,每10-30个核苷酸约有1个错配。对于所有不同的核酸序列,没有最佳的单一杂交或洗涤条件,这些条件可与制造商建议的相同或者可由本领域技术人员调整。在一些实施方案中,本发明方法中使用的探针固定(即,平铺)在称为芯片的载玻片上。例如,DNA微阵列可包括芯片,在该芯片上寡核苷酸(溶液中纯化的单链DNA序列)已被机械印刷在(近似)矩形阵列中,该矩形阵列上的每个斑点对应于编码寡核苷酸的单个DNA样品。总之,该方法包括在适合于在载玻片序列与标记的样品之间发生杂交的条件下,用标记的样品充满DNA微阵列芯片,并且然后洗涤并干燥阵列,并用激光显微镜扫描阵列以检测杂交。在某些实施方案中,存在至少250、500、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、20,000、21,000、22,000、23,000、24,000、25,000、26,000、27,000、28,000、29,000、30,000、31,000、32,000、33,000、34,000、35,000、36,000、37,000、38,000、39,000、40,000、41,000、42,000、43,000、44,000、45,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000个或更多个或其间任何范围的RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 或管家基

因,针对其的探针出现在阵列上(针对单个感兴趣的基因座的匹配/错配探针或平铺在计数为一个感兴趣的基因座的单个感兴趣的基因座上的探针)。每个阵列被探测的RNA SET2、TL1A和/或IFN- γ 或管家基因的最大数目由基因组的大小和受试者物种的遗传多样性决定。DNA芯片是本领域公知的,并且可以以对特定物种具有特异性的序列的pre-5'制造形式购买。在其他实施方案中,可使用诸如上文进一步描述的“下一代测序方法”等测序方法检测和定量SNP和/或DNA拷贝数。

[0130] 标记

[0131] 在一些实施方案中,蛋白质、多肽、核酸、其片段或其连接至本发明方法中使用的接头区域的片段被可检测地标记。例如,可检测标记可为荧光标记,例如,通过掺入核苷酸类似物。适用于本发明的其他标记包括但不限于生物素、亚氨基生物素、抗原、辅因子、二硝基酚、硫辛酸、烯属化合物、可检测多肽、富电子分子、能够通过对底物的作用生成可检测信号的酶和放射性同位素。

[0132] 放射性同位素包括但不限于可与本发明方法结合使用的³²P和¹⁴C。适用于本发明的荧光分子包括但不限于荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、德克萨斯红、5'-羧基荧光素(“FAM”)、2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-6-羧基-荧光素(“JOE”)、N,N,N',N'-四甲基-6-羧基-罗丹明(“TAMRA”)、6-羧基-X-罗丹明(“ROX”)、HEX、TET、IRD40和IRD41。

[0133] 根据本发明适合使用的荧光分子进一步包括:花菁染料,包括但不限于Cy2、Cy3、Cy3.5、CY5、Cy5.5、Cy7和FLUORX;BODIPY染料,包括但不限于BODIPY-FL、BODIPY-TR、BODIPY-TMR、BODIPY-630/650和BODIPY-650/670;以及ALEXA染料,包括但不限于ALEXA-488、ALEXA-532、ALEXA-546、ALEXA-568和ALEXA-594;以及本领域技术人员已知的其他荧光染料。适用于本发明的富电子指示分子包括但不限于铁蛋白、血蓝蛋白和胶体金。

[0134] 还可使用双色荧光标记和检测方案(Shena等人,1995,Science270:467-470)。使用两种或更多种标记可用于检测由于实验条件(例如,杂交条件)的微小差异引起的变化。在本发明的一些实施方案中,至少5、10、20或100种不同颜色的染料可用于标记。这样的标记还将允许同时分析多个样品,这是包含在本发明中。

[0135] 核酸样品、其片段或其连接至可用于本发明方法中的接头区域的片段在允许具有与探针互补的序列的样品核酸与其杂交的条件下与多个寡核苷酸探针接触。根据所用标记的类型,可使用本领域技术人员公知的方法检测杂交信号,该方法包括但不限于X射线胶片、磷光体成像仪或CCD相机。当使用荧光标记的探针时,可优选地通过扫描共聚焦激光显微镜检测转录物阵列的每个位点处的荧光发射。在一个实施方案中,使用适当激发线对所用的两个荧光团中的每一个进行单独扫描。或者,可使用允许在对两个荧光团特异性的波长下同时进行样品照射的激光器,并且可同时分析来自两个荧光团的发射(参见Shalon等人(1996)Genome Res.6,639-645)。在优选的实施方案中,用具有计算机控制的X-Y平台和显微镜物镜的激光荧光扫描仪扫描阵列。使用多线混合气体激光器实现两个荧光团的顺序激发,并且按波长分裂发射的光并用两个光电倍增管检测。例如,这样的荧光激光扫描装置描述于例如Schena等人(1996)Genome Res.6,639-645。或者,可使用光纤束,诸如Ferguson等人(1996)Nat.Biotech.14,1681-1684中描述的光纤束。然后可使用计算机软件分析所得信号以确定RNA SET2、TL1A和/或IFN- γ 以及管家基因的表达。

[0136] 在其他实施方案中,在使用限制性内切核酸酶将受试者的基因组DNA片段化并在

分析前扩增的情况下,扩增可包括受试者的基因组DNA的克隆区域。在这样的方法中,通过克隆过程实现DNA区域的扩增。例如,可将表达载体工程化以表达大量受试者基因组DNA的特定片段(Sambrook和Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 第4版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012))。

[0137] 在其他实施方案中,在使用限制性内切核酸酶将受试者的DNA片段化并在分析前扩增的情况下,扩增包括表达编码来自受试者的基因或者核酸的基因和侧翼基因组区域的核酸。然后分离包含整个转录物(包括内含子)的RNA(前信使RNA)并将该RNA用于本发明的方法中以分析和提供癌症的遗传特征。在某些实施方案中,不需要扩增。在这样的实施方案中,可使用限制性内切核酸酶或其他方法将受试者的基因组DNA或前RNA片段化。所得片段可与SNP探针杂交。通常,与扩增片段的情况下所需的DNA或前mRNA的量相比,需要分离更大量的DNA。例如,在未扩增受试者的核酸的情况下,用于杂交的受试者的DNA样品可为约400ng、500ng、600ng、700ng、800ng、900ng或1000ng或更多的DNA。或者,在其他实施方案中,使用需要非常少量的核酸进行分析的方法,诸如小于400ng、300ng、200ng、100ng、90ng、85ng、80ng、75ng、70ng、65ng、60ng、55ng、50ng或更少,诸如用于分子倒置探针(MIP)测定。这些技术对于分析临床样品特别有用,诸如石蜡包埋的福尔马林固定材料或小芯针活检,该临床样品特征在于易于获得但通常具有降低的DNA质量(例如,小片段化DNA)和/或不提供大量核酸。

[0138] 一旦已确定了表达水平,可基于本领域技术人员使用的公知的方法,使用各种算法分析所得数据。

[0139] 试剂盒

[0140] 本发明还涉及用来诊断患有IBD的受试者

[0141] 和/或鉴别需要治疗的受试者的试剂盒。所述试剂盒可用于时间诊断受试者和/或鉴别需要治疗的受试者的本发明的方法。所述试剂盒为材料或组分的集合,包含至少一种本发明的组合物。因此,在一些实施方案中,所述试剂盒含有包含针对RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的引物和探针的组合物,如上所述。

[0142] 本发明试剂盒中配置的组分的确切性质取决于其预期目的。例如,一些实施方案被配置用于评估风险变体和/或基因表达水平的目的。在一些实施方案中,所述试剂盒被配置用于检测样品中RNASET2的基因表达水平。在其他实施方案中,所述试剂盒被配置用于检测样品中RNASET2和/或TL1A的基因表达水平。在一些其他实施方案中,所述试剂盒被配置用于检测样品中RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的基因表达水平。在各个其他实施方案中,所述试剂盒被配置用于检测样品中的RNASET2风险变体。在其他实施方案中,所述试剂盒被配置用于检测样品中RNASET2甲基化的水平。在一个实施方案中,所述试剂盒特别被配置用于评估哺乳动物受试者的目的。在另一个实施方案中,所述试剂盒特别被配置用于评估人类受试者的目的。在进一步的实施方案中,所述试剂盒被配置用于兽医应用、评估受试者诸如但不限于农场动物、家畜和实验室动物。

[0143] 所述试剂盒中可能包含说明书。“使用说明书”通常包括描述在使用试剂盒的组分以产生期望结果时所采用的技术的清晰表达,该期望结果诸如诊断患有IBD的受试者和/或鉴别患有IBD的需要治疗的受试者。任选地,所述试剂盒还包含其他有用的组分,诸如引物、稀释剂、缓冲液、移液工具或测量工具、或如本领域技术人员将容易认识到的其他有用的用

具。

[0144] 组装在所述试剂盒中的材料或组分可以以保持其可操作性和实用性的任何方便、合适的方式提供给从业者。例如所述组分可以是溶解的、脱水的或冻干的形式；它们可以在室温、冷藏或冷冻温度下提供。这些组分通常包含在合适的包装材料中。如本文所用的短语“包装材料”是指用于容纳所述试剂盒的内容物如本发明的组合物等的一种或多种物理结构。通过公知的方法构建所述包装材料，以优选提供无菌、无污染的环境。所述试剂盒中使用的包装材料是在基因表达测定中常用的包装材料。如本文所用的术语“包装”是指能够容纳各个试剂盒组分的合适的固体基质或材料，诸如玻璃、塑料、纸、箔等。因此，例如，包装可以是用于包含适量的含有针对RNASET2、TL1A、IFN- γ 和/或RNASET2甲基化的引物和探针的本发明组合物的玻璃小瓶。所述包装材料通常具有指示所述试剂盒和/或其组分的内容物和/或目的的外部标签。

[0145] 本发明提供了包括但不限于以下实施方式：

[0146] 1. 一种诊断受试者中的炎性肠病 (IBD) 的方法，其包括：

[0147] 从所述受试者获得样品；

[0148] 使所述样品经受适于确定RNASET2基因处的一种或多种风险变体是否存在的测定；以及

[0149] 基于所述RNASET2基因处的一种或多种风险变体的存在诊断所述受试者中的IBD。

[0150] 2. 根据实施方式1所述的方法，其中炎性肠病为克罗恩病、溃疡性结肠炎或医学难治性溃疡性结肠炎。

[0151] 3. 根据实施方式1所述的方法，其中所述RNASET2基因处的一种或多种风险变体为rs1819333、rs2149092、rs9355610或rs2149085。

[0152] 4. 根据实施方式1所述的方法，其中所述RNASET2基因处的一种或多种风险变体为rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295或rs9366093。

[0153] 5. 根据实施方式1所述的方法，其中所述被诊断患有IBD的受试者表现出巯基嘌呤和抗TNF疗法的治疗失败。

[0154] 6. 根据实施方式1所述的方法，其中所述被诊断患有IBD的受试者确定需要手术干预。

[0155] 7. 根据实施方式6所述的方法，其中所述手术干预为肠切除。

[0156] 8. 根据实施方式1所述的方法，进一步包括确定RNASET2的甲基化水平，其中增加的甲基化指示受试者需要手术干预。

[0157] 9. 一种鉴别患有炎性肠病的受试者进行治疗的方法，所述方法包括：

[0158] 确定RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 的表达水平；以及

[0159] 将所述需要治疗的受试者鉴别为RNASET2水平降低以及/或者TL1A和/或IFN- γ 水平升高的受试者。

[0160] 10. 根据实施方式9所述的方法，其中炎性肠病为克罗恩病、溃疡性结肠炎或医学难治性溃疡性结肠炎。

[0161] 11. 根据实施方式9所述的方法，进一步包括确定RNASET2的甲基化水平，以及将所述需要治疗的受试者鉴别为RNASET2甲基化增加的受试者。

[0162] 12. 根据实施方式11所述的方法，其中所述治疗为手术干预。

- [0163] 13.一种方法,其包括:
- [0164] 使来自受试者的生物样品经受针对RNASET2、TL1A和/或IFN- γ 表达水平的分析;
- 以及
- [0165] 当发现RNASET2的表达减少以及/或者TL1A和/或IFN- γ 的表达增加时,诊断受试者患有IBD。
- [0166] 14.根据实施方式13所述的方法,其中炎性肠病为克罗恩病、溃疡性结肠炎或医学难治性溃疡性结肠炎。
- [0167] 15.根据实施方式13所述的方法,进一步包括确定RNASET2的甲基化水平,其中增加的甲基化指示受试者需要手术干预。
- [0168] 16.一种方法,其包括:
- [0169] 评估来自受试者的生物样品以确定RNASET2处的一种或多种风险变体是否存在;
- 以及
- [0170] 当发现所述RNASET2基因处的一种或多种风险变体存在时,鉴别受试者患有IBD需要治疗。
- [0171] 17.根据实施方式16所述的方法,其中炎性肠病为克罗恩病、溃疡性结肠炎或医学难治性溃疡性结肠炎。
- [0172] 18.根据实施方式16所述的方法,其中所述RNASET2基因处的一种或多种风险变体包括rs1819333、rs2149092、rs9355610和/或rs2149085。
- [0173] 19.根据实施方式16所述的方法,其中所述RNASET2基因处的一种或多种风险变体包括rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295和/或rs9366093。
- [0174] 20.根据实施方式16所述的方法,其中所述被鉴别患有IBD的受试者表现出巯基嘌呤和抗TNF疗法的治疗失败。
- [0175] 21.根据实施方式16所述的方法,其中所述被鉴别患有IBD的受试者确定需要手术干预。
- [0176] 22.根据实施方式21所述的方法,其中所述手术干预为肠切除。
- [0177] 23.根据实施方式16所述的方法,进一步包括确定RNASET2的甲基化水平,其中增加的甲基化指示受试者需要手术干预。
- [0178] 24.一种诊断医学难治性溃疡性结肠炎(MR-UC)的方法,其包括:
- [0179] 从所述受试者获得样品;
- [0180] 使所述样品经受适于确定RNASET2处的一种或多种风险变体是否存在的测定;以及
- [0181] 基于所述RNASET2基因处的一种或多种风险变体的存在诊断所述受试者中的MR-UC。
- [0182] 25.根据实施方式24所述的方法,其中所述RNASET2基因处的一种或多种风险变体为rs1819333、rs2149092、rs9355610或rs2149085。
- [0183] 26.根据实施方式24所述的方法,其中所述RNASET2基因处的一种或多种风险变体为rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295或rs9366093。
- [0184] 27.根据实施方式24所述的方法,其中所述被诊断患有MR-UC的受试者表现出巯基嘌呤和抗TNF疗法的治疗失败。

[0185] 28.根据实施方式24所述的方法,其中所述被诊断患有MR-UC的受试者确定需要手术干预。

[0186] 29.根据实施方式28所述的方法,其中所述手术干预为肠切除。

[0187] 30.根据实施方式24所述的方法,进一步包括确定RNASET2的甲基化水平,其中增加的甲基化指示受试者需要手术干预。

[0188] 31.一种针对患有炎性肠病的受试者选择疗法的方法,所述方法包括:

[0189] 从所述受试者获得样品;

[0190] 使所述样品经受适于确定RNASET2基因处的一种或多种风险变体是否存在的测定;

[0191] 基于所述RNASET2基因处的一种或多种风险变体的存在诊断所述受试者中的医学难治性溃疡性结肠炎(MR-UC);以及

[0192] 针对所述被诊断患有MR-UC的受试者,选择手术作为疗法而不选择巯基嘌呤或抗TNF作为疗法。

[0193] 32.根据实施方式31所述的方法,其中所述RNASET2基因处的一种或多种风险变体为rs1819333、rs2149092、rs9355610或rs2149085。

[0194] 33.根据实施方式31所述的方法,其中所述RNASET2基因处的一种或多种风险变体为rs1819333、rs2149092、rs9355610、rs2149085、rs1410295或rs9366093。

[0195] 34.根据实施方式31所述的方法,进一步包括确定RNASET2的甲基化水平,其中增加的甲基化指示受试者需要手术干预。

[0196] 实施例

[0197] 提供以下实施例以更好地说明要求保护的发明,而不应被解释为限制本发明的范围。在提及具体材料的范围内,这仅仅是为了说明的目的,并不意图限制本发明。本领域技术人员在不发挥创造性能力并且不偏离本发明范围的情况下可以开发等同的手段或反应物。

[0198] 实施例1

[0199] 斑马鱼中RNASET2的缺失导致未消化的rRNA在溶酶体内积累。RNASET2的主要等位基因(i)对IBD、CD(rs9355610)、B1以及ANCA的水平和pos/neg(rs1410925)存在风险,并且(ii)对B3以及ASCA IgA和IgG水平以及pos/neg(rs1410925)存在保护(表2)。主要等位基因rs9355610与来自IBD患者的CD小肠和直肠中较低水平的RNASET2 mRNA表达、EBV转化B细胞和CD3+PBL相关。主要等位基因还与CD乙状结肠中的RNASET2 mRNA相关。低水平的RNASET2和升高的pANCA水平与主要等位基因相关。RNASET2基因座处的甲基化与RNASET2 mRNA表达逆相关。

[0200] 表2:非犹太人质量性状和数量性状关联数据

[0201]

	iChi p	C H	BP	A1- 次要	测试	缺失 数	OR	STA T	*P	
rs9355610	CD	6	167383075	A	ADD	3859	0.754	4.041	E-05	次要 等位 基因 保护
	IBD	6	167383075	A	ADD	4172	0.859 1	- 2.607	9.12 E-03	
	性状	C H	BP	A1- 次要	测试	缺失 数	OR	STA T	P	
rs1410295	B1	6	167345503	C	ADD	538	0.716 8	- 2.588	9.64 E-03	次要 等位 基因 保护
	ANC A	6	167345503	C	ADD	875	0.736 5	- 2.626	8.65 E-03	
	B3	6	167345503	C	ADD	537	1.408	2.337	1.95 E-02	
	ASC A IgG	6	167345503	C	ADD	820	1.379	2.926	3.44 E-03	次要 等位 基因 风险
	ASC	6	167345503	C	ADD	820	1.216	1.843	6.53	
	A 图								E-02	
[0202]							BET A 水 平			次要 等位 基因 保护
	ANC A	6	167345503	C	ADD	872	-4.608	- 3.137	1.77 E-03	
	ASC A IgA	6	167345503	C	ADD	820	4.024	2.363	1.84 E-02	次要 等位 基因 风险
	ASC A IgG	6	167345503	C	ADD	820	5.745	2.821	4.90 E-03	

[0203] *Bonferroni p值1.7E-04

[0204]

所有非犹太人					非犹太人 CD				
CHR	SNP	A1 次要	A2 主要	MAF	CHR	SNP	A1 次要	A2 主要	MAF
6	rs1410295	C	G	0.3541	6	rs1410295	C	G	0.3484
6	rs9355610	A	G	0.3305	6	rs9355610	A	G	0.2915

[0205] 表3:非犹太人队列中IBD和CD的RNASET2主要等位基因存在风险

[0206]

SNP	C H	A 1	A2	缺失 数	OR	P	表 型	OR	P	表 型	OR	P	表 型
rs9355610	6	A	G	5913	0.8218	E-05	IBD	0.756	E-06	CD	0.94	0.3695	UC
rs1819333						3.91			4.04				
*	6	C	A	5813	0.8523	E-04	IBD	0.782	E-06	CD	0.988	0.8575	UC

SNP	C H	A 1	A2	MAF	NC HR
-----	--------	--------	----	-----	----------

[0207]

					OB S
rs1819333	6	C	A	0.4894	212 78
rs9355610	6	A	G	0.3608	212 78

[0208] A1＝次要等位基因；A2＝主要等位基因

[0209] 表4:非犹太人CD中的质量性状关联。非犹太人CD中结肠病的主要等位基因存在风险。

[0210]

CD 表型	CHR	SNP	BP	A1	A2	缺失 数	OR	STAT	p	A1 频率
B1	6	rs62436418	167265792	G	A	592	0.6992	2.853	4.33 - 03	0.3787
B2	6	rs62436418	167265792	G	A	592	1.395	2.648	8.09 - 03	
结肠	6	rs62436418	167265792	G	A	593	0.6275	3.161	1.57 - 03	
B2	6	rs9355610	167303065	A	G	592	1.433	2.709	6.75 E- 03	0.3608
结肠	6	rs9355610	167303065	A	G	593	0.7299	-2.04	4.14 E- 02	

[0211] A1=次要等位基因;A2=主要等位基因

[0212] 表5:RNASET2 SNP与CD和IBD相关。CD和IBD的主要等位基因存在风险。

[0213]

表型	CHR	SNP_rsId	BP	A1	A2	测试	缺失数	OR	STAT	P	位置	MAF
CD	6	rs2149085	167291100	G	A	ADD	4360	0.8414	-4.016	5.93E-05	基因间	0.4751
CD	6	rs1819333	167293537	C	A	ADD	4361	0.8446	-3.93	8.51E-05	基因间	0.4753
CD	6	rs3823208	167267836	G	A	ADD	4361	0.8507	-3.64	2.73E-04	内含子	0.3446
CD	6	rs62436418	167265762	G	A	ADD	4361	0.8569	-3.539	4.01E-04	基因间	0.3861
CD	6	rs2769345	167286384	G	A	ADD	4361	0.8593	-3.53	4.15E-04	内含子	0.4811
CD	6	rs9459813	167287827	A	T	ADD	4361	0.8028	-3.104	1.91E-03	内含子	0.1102
CD	6	rs2236313	167280379	G	A	ADD	4361	0.8784	-3.016	2.56E-03	内含子	0.4476
CD	6	rs9355610	167303065	A	G	ADD	4361	0.9084	-2.163	3.05E-02	基因间	0.3502
IBD	6	rs41269599	167267869	A	G	ADD	5110	0.844	-1.982	4.75E-02	内含子	0.0635

[0214] A1=次要等位基因;A2=主要等位基因

[0215] 表6:RNASET2 SNP与CD的亚临床表型相关

[0216]

表型	CHR	RSID	BP	A1	A2	测试	缺失数	OR	STAT	P	位置	MAF
PDM	6	rs3798303	167274358	G	A	ADD	2093	1.38	3.019	2.54E-03	内含子	0.09853

[0217]

虹膜炎	6	rs41269599	167267869	A	G	ADD	1436	2.806	2.973	2.95	E-03	内含子	0.06876
虹膜炎	6	rs181130555	167277010	D	-	ADD	1434	2.744	2.932	3.37	E-03	内含子	0.07108
虹膜炎	6	rs3777721	167272065	C	G	ADD	1436	2.761	2.92	3.50	E-03	内含子	0.07084
虹膜炎	6	rs41269597	167267663	C	G	ADD	1436	2.711	2.868	4.13	E-03	内含子	0.07234
虹膜炎	6	imm_6_167277028	167277028	A	-	ADD	1435	2.609	2.776	5.51	E-03	内含子	0.07369
虹膜炎	6	rs1079145	167280714	A	G	ADD	1436	2.424	2.717	6.59	E-03	内含子	0.0893
虹膜炎	6	rs10946197	167268406	A	C	ADD	1436	0.3753	2.717	- 6.60	E-03	内含子	0.256
PDM	6	rs3777723	167273691	A	G	ADD	2093	1.334	2.648	8.09	E-03	内含子	0.09552

[0218] A1=次要等位基因;A2=主要等位基因;D=缺失

[0219] 表7:RNASET2与非犹太CD患者中亚临床表型的关联

[0220]

表型	CH	RSID	BP	A1	A2	测试	缺失数	OR	STAT	P	MAF
虹膜炎	6	rs1079145	167280714	A	G	ADD	680	3.646	2.99	2.79 E-03	0.07357
虹膜炎	6	rs3777721	167272065	C	G	ADD	680	3.844	2.97	2.98 E-03	0.05932
虹膜炎	6	rs181130555	167277010	D	-	ADD	679	3.622	2.909	3.63 E-03	0.0613
虹膜炎	6	imm_6_167277028	167277028	A	-	ADD	679	3.511	2.848	4.40 E-03	0.06168

[0221]

虹膜炎	6	rs3778439	167278341	A	G	ADD	680	3.535	2.671	7.55 E-03	0.05277
虹膜炎	6	rs3734246	167278058	A	G	ADD	680	3.535	2.671	7.55 E-03	0.05277
PDM	6	rs2769339	167275844	G	A	ADD	977	1.553	2.929	3.41 E-03	0.09707
PDM	6	rs2757045	167270953	G	A	ADD	977	1.499	2.73	6.34 E-03	0.09977
PDM	6	rs3798303	167274358	G	A	ADD	977	1.491	2.669	7.62 E-03	0.09669
PDM	6	rs2757048	167271110	A	G	ADD	977	1.479	2.637	8.37 E-03	0.099
葡萄膜炎	6	rs3777723	167273691	A	G	ADD	674	3.78	2.657	7.89 E-03	0.09091

[0222] A1=次要等位基因;A2=主要等位基因;D=缺失

[0223] 表8:RNASET2与CD患者中血清学的关联

[0224]

表型	CH R	SNP_rsId	BP	A 1	A2	测试	缺失数	BETA /OR	STAT	P	位置	MAF
CBIR	6	rs425145	167321292	G	A	ADD	2432	4.175	2.167	3.03 E-02	基因间	0.1121
CBIR	6	rs415356	167326817	G	A	ADD	2432	4.16	2.164	3.06 E-02	基因间	0.1121
CBIR	6	rs435359	167317604	G	A	ADD	2432	4.16	2.164	3.06 E-02	基因间	0.1123
CBIR	6	rs375883	167304704	T	A	ADD	2430	4.119	2.14	3.24 E-02	基因间	0.112
CBIR	6	rs62438869	167320907	A	G	ADD	2432	-3.722	- 2.101	3.57 E-02	基因间	0.1281

[0225]

CBIR	6	rs9459813	167287827	A	T	ADD	2432	4.073	2.015	4.40 E-02	内含子	0.09872
CBIR	6	rs443297	167304286	A	G	ADD	2432	3.978	1.972	4.88 E-02	基因间	0.09947
IgG.ASCA	6	rs1410295	167265493	C	G	ADD	2326	2.342	1.936	5.29 E-02	基因间	0.3474

[0226] A1=次要等位基因;A2=主要等位基因

[0227] 表9:RNASET2与非犹太CD患者血清学的关联

[0228]

血清学	CHR	RSID	BP	A1	A2	测试	缺失数	BETA	STAT	P	MAF
ANCA	6	rs41269599	167267869	A	G	ADD	1143	-7.159	-2.709	E-03	6.85 0.05586
CBIR	6	rs9459813	167287827	A	T	ADD	1208	8.021	2.854	E-03	4.40 0.1159
CBIR	6	rs9459812	167287711	A	C	ADD	1208	7.699	2.735	E-03	6.33 0.1156
IgA.ASCA	6	rs3823208	167267836	G	A	ADD	1130	4.153	3.102	E-03	1.97 0.3139
IgG.ASCA	6	rs3823208	167267836	G	A	ADD	1130	4.99	3.115	E-03	1.89 0.3139
IgG.ASCA	6	imm_6_167277028	167277028	A	-	ADD	1129	8.352	2.725	E-03	6.53 0.06168

[0229] A1=次要等位基因;A2=主要等位基因

[0230] 表10:RNASET2与小肠中表达的关联

[0231]

SNP_rsid	基因	beta	p值	FDR
rs72079749	RNASET2	0.151129328	1.66E-04	0.371075825

rs66591848	RNASET2	0.154066135	2.27E-04	0.42289639
rs1951459	RNASET2	0.161888591	2.39E-04	0.429556929
rs4710149	RNASET2	0.161888591	2.39E-04	0.429556929
rs933243	RNASET2	0.161888591	2.39E-04	0.429556929
rs9355610	RNASET2	0.161888591	2.39E-04	0.429556929
rs9356551	RNASET2	0.161888591	2.39E-04	0.429556929
rs9366078	RNASET2	0.161888591	2.39E-04	0.429556929
rs1819333	RNASET2	0.15479148	3.22E-04	0.461149469
rs2013815	RNASET2	0.15479148	3.22E-04	0.461149469
rs2149085	RNASET2	0.15479148	3.22E-04	0.461149469
rs2769345	RNASET2	0.128393311	3.08E-03	0.777560209
rs2236313	RNASET2	0.096154247	3.09E-02	0.908151161

[0232] 小肠表达的主要等位基因存在风险。

[0233] 表11:RNASET2与大肠中表达的关联

CD	snp_rsid	基因	beta	t-stat	p 值	FDR
直肠	rs683571	RNASET2	-0.57902	-3.65206	0.00115	0.460077
直肠	rs2031846	RNASET2	-0.48099	-3.27469	0.002992	0.679028
直肠	rs62436763	RNASET2	-0.50894	-3.24339	0.003235	0.692932
直肠	rs41463945	RNASET2	-0.58473	-3.11594	0.004434	0.693762
CD	snp_rsid	基因	beta	t-stat	p 值	FDR
乙状结肠	rs162289	RNASET2	0.147287	2.955434	0.007311	0.619358
乙状结肠	rs162291	RNASET2	0.147287	2.955434	0.007311	0.619358

[0234]

[0235]

乙状结肠	rs162293	RNASET2	0.147287	2.955434	0.007311	0.619358
乙状结肠	rs162294	RNASET2	0.147287	2.955434	0.007311	0.619358
乙状结肠	rs162295	RNASET2	0.147287	2.955434	0.007311	0.619358
乙状结肠	rs162297	RNASET2	0.147287	2.955434	0.007311	0.619358
乙状结肠	rs2236312	RNASET2	0.162431	3.419281	0.002456	0.451404
乙状结肠	rs3756838	RNASET2	0.14602	3.147931	0.00467	0.576607
乙状结肠	rs3798307	RNASET2	0.162431	3.419281	0.002456	0.451404
乙状结肠	rs62436424	RNASET2	0.14602	3.147931	0.00467	0.576607
乙状结肠	rs7772112	RNASET2	0.14602	3.147931	0.00467	0.576607
乙状结肠	rs9366076	RNASET2	0.14602	3.147931	0.00467	0.576607
UC	snp_rsId	基因	beta	t-stat	p 值	FDR
直肠	rs57237533	RNASET2	0.572002	3.665898	0.001643	0.436982
直肠	rs56213919	RNASET2	0.572002	3.665898	0.001643	0.436982
UC	snp_rsId	基因	beta	t-stat	p 值	FDR
乙状结肠	rs10946198	RNASET2	-0.36397	-3.11588	0.008192	0.704927
乙状结肠	rs1819333	RNASET2	-0.36397	-3.11588	0.008192	0.704927
乙状结肠	rs2149085	RNASET2	-0.36397	-3.11588	0.008192	0.704927
乙状结肠	rs2769345	RNASET2	-0.36397	-3.11588	0.008192	0.704927

[0236] 表12:小肠组织表达的命中(hits)

[0237]

基因座 中的基 因	IBD iCHIP (P 值) *	亚表型关 联 (CD) *	小肠 eQTL p 值	“近基 因”途径 eQTL p 值	细胞 位置	EB V 细 胞 系	公开的 临床前 IBD 模 型
-----------------	----------------------------	---------------------	-------------------	----------------------------	----------	------------------------	--------------------------

[0238]

RNASE T2_ FGFR10 P	IBD: (9.7E- 03) CD: (5.3E- 05)	B2, 血清学	<1E-04 RNASE ET2	N/A	细胞 内 (RNS ET2)	是	否
-----------------------------	---	------------	------------------------	-----	-------------------------	---	---

[0239] 表13:RNASET2外显子组芯片

[0240]

疾病	SNP/rsID	案例数	复制数	CHR	BP	A1	A2	MAF	缺失数	OR	P	基因列表	功能 GVS	关联 基因座
CD	exm- rs2236313	5742	5725	6	1.7E+08	G	A	0.4134	11467	0.8932	3.28E-05	RNASET 2	内含子	IBD
IBD	exm- rs2236313	10523	5725	6	1.7E+08	G	A	0.4134	16248	0.9219	0.00061	RNASET 2	内含子	IBD

[0241] A1=次要等位基因;A2=主要等位基因

[0242] 等位基因风险由优势比 (OR) 定义。当示出A1等位基因和<1的OR时,则主要等位基因是风险等位基因 (A2是风险)。如果OR>1,则次要等位基因 (A1) 是风险等位基因。了解A1和优势比让你确定哪个等位基因存在风险,以及哪个等位基因存在保护。

[0243] 实施例2

[0244] 使用RNAseq定义了经由增强的IFN- γ 表达的炎症TL1A增强的分子机制。在未处理的条件下分析CD4⁺T细胞或在用1 μ g量级的IL12和IL18或者IL12和IL18和TLA1处理的条件下分析CD4⁺T细胞。在10ng的量下,当用IL12和IL18和TLA1处理CD4⁺T细胞时,分析CD4⁺T细胞是否具有IFN- γ 。RNAseq数据预筛选去除了所有失败的探针数据,所有基因FPKM>5d样品少于3个。使用该标准,8695个基因通过预筛选,并且使用BRB阵列工具进行使用成对样品的类别比较。

[0245] 发明人证明在分子水平上,除介导RNASET2表达降低外,TL1A处理还介导IFN- γ 的表达增强。RNASET2的表达降低1) 在患有慢性活动性疾病的CD患者中检测到,2) 在患有需要手术干预的难治性疾病的CD患者中检测到,3) 在抗TNF疗法初治CD患者中检测到,4) 与OmpC⁺、ANCA-血清学因子相关,以及5) 与RNASET2风险SNP rs9355610、rs1819333、rs2149085相关。

[0246] 实施例3

[0247] TNFSF15及其编码TL1A的蛋白质与IBD相关,并且是粘膜炎症的关键中介物。在IBD患者中,升高的TL1A水平与疾病严重程度和基因型相关。TL1A介导IFN- γ 产生的显著增强。TL1A应答生物标志物通过RNAseq进行鉴别,并通过qPCR在从IBD患者(20名克罗恩病[CD]、20名溃疡性结肠炎[UC])分离的T细胞中与正常患者(NL)相比进行验证。来自NL和IBD患者

的另一队列的样品用于在GWAS的背景下验证和测量表达/甲基化数量性状基因座 (eQTL/mQTL)。RNAseq表达聚集将经TL1A处理的细胞与未经处理的细胞区分开。编码细胞外T2 RNA酶的基因RNASET2在TL1A处理后下调。先前的研究将RNASET2与CD易感性联系起来。CD患者中的RNASET2表达在“严重”疾病中相对于轻度疾病中更低,该严重疾病即多次疾病发作 ($p < 0.009$)、医学难治性 ($p < 0.024$)。RNASET2 rs1819333 ($p = 0.015$) 的疾病风险等位基因以及与增强的TL1A表达、rs6478108、rs6478109和rs7848647相关的TNFSF15等位基因 ($p = 0.01$) 与降低的RNASET2表达相关。此外,RNASET2的siRNA沉默增强了TL1A介导的IFN- γ 分泌。不受任何特定理论约束,发明人认为RNASET2的下调是TL1A驱动的严重CD的标志。

[0248] 在来自NL、CD或UC患者的新鲜分离的未经刺激的T细胞的单独队列中检查RNASET2表达和DNA甲基化。RNASET2基因座处的甲基化与mRNA表达逆相关。RNASET2等位基因的eQTL与表达降低相关。在患有需要手术干预的严重疾病的CD患者中观察到显著增强的RNASET2甲基化(表14)。在NL或轻度疾病患者中未观察到相关性。同样,RNASET2甲基化增加与关联TL1A表达增强的TNFSF15风险等位基因相关(表14)。在表观遗传学上,RNASET2 eQTL/mQTL区域与组蛋白H3K4me3和H3K27ac以及DNA酶HS激活位点重叠。该区域与针对NF κ B、jun、ATF3和CEBPD的转录因子结合共定位——所有这些因子都响应于TL1A处理而上调。结果将RNASET2鉴别为参与调控IFN- γ 产生的TL1A应答基因。在患有严重疾病的CD患者中,存在超甲基化和降低的RNASET2表达,这可能反映先前在体内暴露于TL1A。因此,不受任何特定理论约束,发明人认为RNASET2充当新型潜在疾病严重程度生物标志物,以鉴别最可能受益于抗TL1A疗法的CD患者的亚组。

[0249] 表14:与TNFSF15风险等位基因相关的RNASET2甲基化增加。

	RNASET2					TNFSF15		
	rs62436	rs2236	rs2769	rs1819	rs9355	rs6478	rs6478	rs7848
p 值	418	313	345	333	610	108	109	647
[0250] eQTL	0.013	0.024	0.038	0.038	0.011	na	na	na
mQTL (RNASE T2)	0.001	2.7 x 10 ⁻¹³	2.7 x 10 ⁻¹³	2.7 x 10 ⁻¹³	1.4 x 10 ⁻⁹	0.005	0.013	0.003

[0251] 发明人进一步分析了3个队列的患者,包括11名UC CD3+PBT(医学难治性)、43名CD CD3+PBT(23名医学难治性,20名轻度)和17名正常CD3+PBT。样品在Infinium 450甲基化阵列上运行,而11个CD、12个UC和4个NL样品在Infinium表达阵列上运行。发明人证明,TL1A处理后CD4+T细胞的RNASET2表达降低,并且RNASET2的沉默增强了TL1A介导的IFN- γ 分泌。

[0252] 表15:临床特征

[0253]	RNASET2	表达	甲基化
	多次疾病发作	↓	
	需要手术干预的难治性疾病	↓	↑
	抗TNF疗法初治患者	↓	↑
[0254]	RNASET2 风险等位基因 SNP rs9355610、rs1819333、rs62436418、rs22236313、rs2769345	↓	↑
	RNASET2风险等位基因SNP		
	难治性疾病	↓	↑
	正常或轻度疾病		↔

[0255] 表观遗传学研究表明,RNASET2 eQTL/mQTL区域1) 与组蛋白H3K4me3和H3K27ac的表观遗传激活位点重叠,2) 与DNA酶HS的表观遗传激活位点重叠,3) 与针对NFkB、jun、ATF3和CEBPD的转录因子结合共定位,所有这些因子都响应于TL1A处理而上调。此外,来自外周血的初级T记忆细胞中的增强子元件、CD4⁺幼稚T细胞中的DNA酶HS位点和eQTL RPS6KA2单核细胞与rs1819333等位基因连接。

[0256] 实施例4

[0257] TL1A与IL-12/IL-18协同作用导致IFN- γ 表达的快速(在6-8小时内)和显著增强。使用RNAseq分析来鉴别调节IFN- γ 表达的TL1A应答基因。20种基因在TL1A激活的总CD4⁺T细胞群中差异表达(至少2倍)。这可能主要是由于分泌IFN- γ 的T细胞仅构成总CD4⁺T细胞群的非常小的亚组(1%-3%)的事实(图15)。将来自健康供体的CD4⁺T细胞用IL12/IL18和TL1A处理8小时,然后将其分选为分泌IFN- γ 的亚组和不分泌IFN- γ 的亚组(图15),并进行mRNA的全基因组转录分析(GWAS)。全部8075个表达基因的组的无监督层次聚类将TL1A介导的分泌IFN- γ 的亚组和不分泌IFN- γ 的亚组清楚地区分开(图16)。

[0258] 基于表达水平进行将分泌IFN- γ 的亚组和不分泌IFN- γ 的亚组分类的类别预测分析。最佳预测物转录物列表由764个基因组成,该基因在分泌IFN- γ 的亚组之间具有至少两倍的差异表达(p值<0.00005)(图17)。基因本体分析示出,存在于与蛋白酶体、细胞凋亡、RNA表达和T细胞受体信号传导相关的途径中的差异表达的基因富集,并且这些基因为英夫利昔单抗(Infliximab)的下游靶标(激活z评分=-4,p值=2e-15)。GWAS已鉴别了多种IBD风险变异体SNP。与其他区域中的预测物基因比例相比,位于距IBD风险SNP 0.5MB内的转录物比例显著增加(14%与9%,p值=3.3e-6)。实际上,差异表达的转录物映射到所有IBD风险相关区域的34%(图18)。不受任何特定理论约束,数据证明了这些基因强有力的贡献,不仅在于TL1A介导的IFN- γ 表达调节,而且在于作为调节IBD易感性和发病机制的影响因子。

[0259] 火山图使与IBD风险基因座相关的差异表达的预测物转录物的显著性和大小可视化,允许我们对候选基因按优先级排序(图20)。在这些基因中,TL1A介导的IFN- γ 表达被确认是最显著上调的,而RNASET2被确认是最显著下调的(图20)。RNASET2,一种核糖核酸酶的Rh/T2/S家族的成员,是唯一表现出TL1A介导的表达下调超过5倍的IBD风险相关基因。GWAS已将RNASET2鉴别为潜在的IBD风险基因。由于RNASET2在IBD发病机制中的功能性作用未

知,因此检查IBD中RNASET2表达的调控。不受任何特定理论约束,发明人认为,由于RNASET2为“类别预测”基因,因此可在总CD4+T细胞中检测差异表达。分离来自CD、UC患者或NL对照的静息CD4+T细胞或经IL12/IL18处理的CD4+T细胞,并在存在或不存在TL1A的情况下比较RNASET2水平达8小时。如图7所示,与我们在来自NL供体的细胞中观察到的相反,IBD患者未显示TL1A介导的RNASET2表达水平降低。相反,与轻度疾病病程相比,降低的RNASET2表达水平与具有“严重”疾病病程的CD患者相关。从表现出每年多次疾病发作的CD患者分离的细胞中RNASET2表达显著较低 ($p<0.001$) (图8A和图8C),并且同样在需要手术干预以进行疾病管理的医学难治性CD患者中检测到RNASET2表达降低 ($p<0.024$) (图8B)。在UC患者中也观察到类似趋势。

[0260] 进行基因表达数量性状 (eQTL) 以表征RNASET2基因变异与基因转录物表达水平之间的功能相关性。高加索人群中的IBD风险SNP标记、CD韩国人群中鉴别的rs1819333和rs2149085均位于RNASET2启动子区域内距转录起始位点-3.5kb内。额外的启动子SNP rs9355610已显示与格雷夫斯 (Grave's) 自身免疫甲状腺疾病的易感性相关。在从CD患者分离的外周细胞中,RNASET2疾病风险等位基因rs1819333 ($p=0.015$) 和rs2149085 ($p=0.015$) 以及rs9355610 ($p=0.04$) 显示eQTL,并且与RNASET2表达降低相关 (图9)。不受任何特定理论约束,数据表明通过RNASET2下调改变IFN- γ 表达的途径。使用siRNA介导的沉默确认了RNASET2在调控IFN- γ 表达中的功能性作用。用靶向RNASET2 mRNA的siRNA或对照siRNA转染CD4+T细胞,然后用IL12/IL18和TL1A处理该CD4+T细胞。RNASET2 mRNA自身的表达显示通过RNASET2 siRNA的60%-70%抑制 (图21A)。同时,与用对照乱序siRNA转染的细胞相比,在用RNASET2 siRNA转染的细胞中观察到IFN- γ 表达的显著增强 (>1.5 倍) (图21B)。

[0261] 不受任何特定理论约束,发明人认为,考虑到IFN γ 在克罗恩病发病机制中的关键作用,这些数据共同表明RNASET2的下调可充当TL1A驱动的严重CD的生物标志物。在来自NL、CD和UC患者的新鲜分离的未刺激T细胞的单独队列中检查RNASET2表达。由于DNA甲基化影响基因表达,并且由于大多数疾病风险遗传多态性映射到经历表观遗传修饰的区域中的转录外显子组之外,因此也检查了RNASET2的DNA甲基化状态。在来自CD和UC患者的未刺激T细胞中,在IFN γ 表达水平与RNASET2之间观察到逆相关 (图22)。此外,如图10所示,表达与甲基化之间存在显著的负相关,其与距离逆相关,主要在转录起始位点 (TSS) 上游和下游50kb内。此外,IBD疾病风险遗传变体与甲基化和表达水平相关区域之间存在显著重叠 (图10)。在第一内含子内的CpG位点 (1.4kb) 处观察到最强的相关性 ($p=8.5 \times 10^{-5}$) (图23)。

[0262] RNASET2基因变异与基因转录物表达水平之间的功能相关性在来自患有难治性疾病的IBD患者的未刺激外周T细胞中得到确认 (图11),其中表达降低与RNASET2风险等位基因变体SNP相关。此外,对于使用基因表达微阵列从小肠手术切除获得的组织中提取的mRNA,观察到类似的eQTL (图12)。还检查了RNASET2基因变异与甲基化mQTL之间的相关性,并观察到患有难治性疾病的IBD患者中甲基化增加的显著mQTL (图13A-图13D)。相反,在从患有轻度疾病的患者或NL受试者分离的细胞中未检测到mQTL。

[0263] 影响基因表达 (eQTL) 和DNA甲基化 (mQTL) 的这些遗传变异的作用被映射到跨越RNASET2基因座的所有信息性SNP (图14)。在从患有医学难治性疾病的IBD患者分离的T细胞中,在CCR6基因座内,RNASET2 TSS下游10kb至上游-170Kb存在强烈重叠的eQTL和mQTL。同

样,在将未刺激的外周T细胞与患有难治性疾病患者的小肠手术切除的RNASSET2表达进行比较时,eQTL存在显著的重叠。相反,在患有轻度疾病的患者或NL受试者中未检测到mQTL(图14A和图14B)。不受任何特定理论约束,数据表明RNASSET2的下调是TL1A介导的IFN- γ 表达增强的组分。此外,具有已知IBD风险变体SNP的IBD患者中RNASSET2的表观遗传调节和基因表达降低与更严重的疾病病程相关。

[0264] 实施例5

[0265] 方法

[0266] 将从NL(正常)供体分离的外周T细胞在存在或不存在TL1A的情况下培养8小时。使用通过流式细胞术纯化的产生干扰素 γ (IFN- γ)的细胞亚组,通过RNA测序(RNA-seq)和定量聚合酶链反应(qPCR)进行基因表达谱分析。使用酶联免疫吸附测定(ELISA)和小干扰RNA(siRNA)抑制和qPCR测量来核糖核酸酶T2(RNASSET2)在TL1A介导的IFN- γ 表达中的作用。使用从以类似方式刺激的IBD患者(20名CD和20名UC)分离的外周T细胞研究RNASSET2在IBD中的作用。使用来自NL和IBD患的未刺激T细胞者或小肠(SB)手术切除的附加样品来验证发现,并基于基因型分型和临床数据来分析表达数量性状基因座(eQTL)和甲基化数量性状基因座(mQTL)。

[0267] 筛选转录因子(TF)结合位点预测的基序破坏对候选调控性SNP进行鉴别。使用蛋白质组学分析和细胞因子分泌的测量来确定RNASSET2指导的小干扰RNA(siRNA)对蛋白质表达的影响。通过流式细胞术测量细胞聚集。

[0268] 研究主题

[0269] 通过Cedars-Sinai医疗中心的F.Widjaja基金会炎症性肠病和免疫生物学研究所(F.Widjaja Foundation Inflammatory Bowel and Immunobiology Research Institute)的MIRIAD IBD Biobank招募人类受试者。所有对照受试者均为健康个体,不使用药物,且没有已知的自身免疫病或IBD的个人史或家族史。从所有参与的受试者获得知情同意书(经Cedars-Sinai医疗中心的机构审查委员会批准)。如果IBD患者在药物治疗失败后需要手术干预以进行疾病管理,则被定义为“难治性”。如果IBD患者没有进行先前手术并且在样品采集时没有活动性疾病,则被定义为“轻度”。与每年无疾病发作的患者相比,表现出每年疾病发作一次或多次的CD患者被定义为具有“严重疾病”。从564名经历过手术切除的CD患者前瞻性地收集临床特征。

[0270] 淋巴细胞群分离

[0271] 通过Ficoll-Hypaque梯度分离从健康志愿者分离外周血单核细胞(PBMC)。使用CD3免疫磁珠(Miltenyi Biotech,Auburn,CA)分离CD3⁺T细胞(PBT),其纯度为至少95%。通过使用磁珠(Stemcell Technologies,Vancouver,BC,Canada)耗尽的负选择分离CD4⁺T细胞,其纯度为至少95%。

[0272] Infinium 450K微珠芯片测定

[0273] 使用Zymo EZ DNA甲基化试剂盒(Zymo Research)以1 μ g的输入使来自CD3⁺T细胞的DNA样品进行亚硫酸氢盐转化。按照Illumina Infinium甲基化说明书,使用Infinium人甲基化450微珠芯片试剂盒(Illumina Inc.,San Diego,CA)进行测定。使用GenomeStudio软件对数据进行可视化和归一化。将甲基化 β 值重新计算为(甲基化探针信号)/(总信号)的比率。

[0274] IFN- γ 测定

[0275] 通过扩增ELISA来测量IFN- γ 。将Greiner Bio-One(Longwood,FL)ELISA板用100 μ l的5 μ g/ml单克隆抗IFN- γ (BD Biosciences,Woburn,MA) 涂覆过夜。添加样品和标准品达24小时,然后添加100 μ l的2.5 μ g/ml多克隆生物素化兔抗IFN- γ (BD Biosciences) 达2小时。随后添加100 μ l的1/1000稀释的碱性磷酸酶偶联的链霉亲和素 (Jackson ImmunoResearch Laboratories,West Grove,PA) 达2小时。添加底物、0.2mM NADP(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO) 达30分钟,然后添加扩增剂(3%2-丙醇,1mM碘硝基四唑紫,75 μ g/ml醇脱氢酶和50 μ g/ml心肌黄酶;Sigma-Aldrich) 达30分钟。使用E max读板仪(Molecular Devices,Sunnyvale,CA) 在490nm处读板。

[0276] CD3⁺T细胞的基因表达测定

[0277] 使用Illumina全基因组表达微珠芯片(HumanHT-12_V4_0_R2) (Illumina) 或Nugen人FFPE RNA-seq文库系统进行CD3⁺T细胞的表达分析。使用BRB阵列工具和R中的lumi包处理Illumina基因表达数据。使用稳健样条归一化对数据进行log₂转化和归一化。用Nugen人FFPE RNA-seq文库系统制备RNA-Seq文库。工作流包括cDNA生成、片段化、末端修复、接头连接和PCR扩增。针对一个泳道中的复用样品使用不同接头。在Illumina NextSeq 500上进行单次读取75次运行的测序。在Illumina SAV上进行数据质量检查。用Illumina Bcl2fastq2 v 2.17程序进行解复用。首先使用Bowtie2版本2.1.0将读取映射到最新的UCSC转录物组,并使用RSEM v1.2.15估计基因表达水平。使用FPKM使基因表达归一化。siRNA抑制和定量蛋白质组学分析

[0278] 将新鲜分离的CD4⁺T细胞(15x 10⁶) 在含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养过夜,在250 μ L新鲜培养基中洗涤、重悬,并在BTX Electro Square Porator ECM 830 (Genetronics,Inc.,San Diego,CA) 中使用4mm(间隙宽度) 比色皿在150pmole RNASET2 siRNA或对照siRNA存在下进行电穿孔(600V,进行9个500 μ sec的脉冲,脉冲间100 μ s)。siRNA抑制中使用的序列示于表16中。

[0279] 表16:siRNA序列

[0280]

序列名称	序列	SEQ ID NO
RNASET2 siRNA序列正向	5'-GCAAGAGAAAUUCACAAACUGCAGC-3'	7
RNASET2 siRNA序列反向	5'-	8

[0281]		GCUGCAGUUUGUGAAUUUCUCUUGCUU-3'	
	对照siRNA序列正向	5'-CUUCCUCUCUUUCUCUCCCUUGUGA-3'	9
	对照siRNA序列反向	5'-UCACAAGGGAGAGAAAGAGAGGAAGGA-3'	10

[0282] 如所述(Qu等人, Sci Rep 2016;6:32007)进行基于串联质谱标记(TMT)的定量蛋白质组学分析。对于每个样品,使用过滤器辅助的样品制备(FASP)将50 μ g蛋白质平行消化成胰蛋白酶肽(Wisniewski等人, Nat. Methods 2009;6:359-62)。将衍生自8个样品的肽和合并内标用一组TMT10plex试剂(Thermo Scientific)进行标记,混合、脱盐、通过高pH液相色谱分离成24个级分并且合并成8个级分。在50cm EASY喷雾分析柱上解析分级的肽,并使用用于串联质谱分析的高能碰撞解离(HCD)方法,通过LTQ Orbitrap Elite质谱仪(Thermo Scientific)以数据依赖性采集模式进行分析。使用SEQUEST算法,用Proteome Discoverer (2.1版)针对人Uniprot数据库(2015年10月17日发布,含有20,982个序列)搜索获取的原始数据。设定严格的1%错误发现率以过滤肽和蛋白质鉴别。具有>30%前体离子干扰的肽被排除在蛋白质定量之外。

[0283] 流式细胞术和细胞聚集分析

[0284] 在用重组人IL-12(500pg/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN)和IL-18(50ng/ml, R&D Systems)和TL1A(100ng/ml, Fitzgerald Industries International, Acton, MA)激活细胞8h后,通过流式细胞术分离分泌IFN- γ 的CD4⁺T细胞。使用IFN- γ 分泌测定细胞富集和检测试剂盒(Miltenyi Biotec, San Diego, CA)来检测分泌IFN- γ 的CD4⁺T细胞。在FACS Aria II(BD Biosciences, San Jose, CA)上分选细胞。

[0285] 细胞内IFN- γ 产生和细胞聚集分析基本上如所述进行(Dezorella等人, Cytometry B Clin Cytom 2016:90:257-66)。简言之,细胞或者是静息的或者用IL12/IL18和TL1A刺激24h,并在最后4h添加Berfeldin A(10ug/ml)。将细胞用4%多聚甲醛固定,用0.1% Triton X-100和0.2%皂苷透化,并针对细胞内IFN- γ (brilliant violet 421-IFN- γ , eBioscience)或等位基因对照进行染色。洗涤样品并针对细胞聚集进行染色(碘化丙锭)。在CyAnTM ADP流式细胞仪(Dako, Carpinteria, CA, USA)上获得细胞,并用FlowJo软件(TreeStar Inc., Ashland, OR, USA)进行分析。对于LFA1阻断分析,将细胞在锥形微孔板中与单克隆对照小鼠IgG1k(15ug/ml)或抗LFA1(TS1/18)一起预温育过夜,然后用IL12、IL18和TL1A刺激24小时。

[0286] qPCR

[0287] 使用RNeasy试剂盒(Qiagen, Inc., Valencia, CA)分离总RNA,并通过实时定量RT-PCR测量基因表达。使用Omniscript试剂盒和方案(Qiagen),用寡核苷酸(dT) (Integrated DNA Technologies)作为引物,在每个RT-PCR反应中使用500纳克总RNA。使用Mastercycler[®]ep realplex PCR检测系统(Eppendorf, Hauppauge, NY)进行实时PCR。一式两份地运行PCR测定。引物序列(Integrated DNA Technologies)跨越内含子,并且如表

17所示。

[0288] 表17:引物序列

	序列名称	序列	SEQ
			ID NO
[0289]	IFN- γ 正向	5' - TTGGGTTCTCTTGGCTGTTACT - 3'	11
	IFN- γ 反向	5' - ATCCGCTACATCTGAATGACCTG - 3'	12
	RNASET2正向	5'-CTTCCTTGCAGGACTCACCAC-3'	13
	RNASET2反向	5'- GCTGATGTGAAGGTGCAAACCTC-3'	14
	ACTB正向	5'- CGTGCTGCTGACCGAGG -3'	15
	ACTB反向	5'- AAGGTCTCAAACATGATCTGGGT -3'	16

[0290] 基因型分型

[0291] 使用Illumina人免疫微珠芯片阵列获得高加索受试者的基因型数据。基于以下条件排除标志物:Hardy-Weinberg平衡检验的显著性阈值 $p \leq 10^{-3}$;基因型分型率 $<100\%$ (针对eQTL和mQTL关联) 或 $<98\%$ (针对GWAS), 以及次要等位基因频率 $<5\%$ 。使用血缘同一性来使用PLINK排除相关个体 (P_i -hat评分 >0.25)。使用ADMIXTURE进行种族分析, 以获得个体的种族比例估计。高加索比例 ≥ 0.75 的个体被归类为高加索人。基于相关性检查 (使用截止 p_i -hat评分) 鉴别独立的高加索人样品, 并使用这些样品进行混合物的种族分析和所有后续关联。使用TRACE产生针对独立高加索人样品的基因型数据的首要成分。使用LDHeatmap R包来使用139名受试者的基因型数据产生针对RNASET2基因座中SNP的LD图。IIBDGC队列中QC和基因型分型的细节可见于先前的报道 (Jostins等人, Nature 2012;491:119-24和Liu等人, Nat Genet 2015;47:979-86)。简言之, 在去除具有 $>5\%$ 缺失数据的样品、群体分层为非欧洲血统或具有异常平均强度值的样品、SNP具有 $>2\%$ 缺失数据或HWE p 值 $<10^{-10}$ 的对照之后, 分析中包含使用免疫芯片划分基因型的18,602个CD病例和33,938个非IBD对照。在来自IIBDGC的CD病例中, 如先前报道的 (Cleynen等人, Lancet 2016;387:P156-67), 基于蒙特利尔分类采集了具有疾病行为信息的13,511个病例 (描述为B1非狭窄性非穿透性疾病, B2狭窄性疾病和B3穿透性疾病)。

[0292] 小肠手术样品的表达数据

[0293] 从圣路易斯华盛顿大学 (Washington University, St.Louis.) 的基因组技术访问中心 (Genome Technology Access Center) 获得使用Agilent特征提取软件提取的单通道微阵列表达数据。使用R版本3.2.2中实现的LIMMA包对技术复用中可用的原始表达数据进行归一化。表达数据预处理包括表达数据的背景校正, 随后是 \log_2 转化和分位数归一化。

[0294] eQTL和mQTL映射

[0295] 在Matrix eQTL R包中实现eQTL和mQTL映射。对于小肠手术样品, 使用独立的高加索人样品 ($n=85$) 进行eQTL映射。使用具有加性基因型效应的线性回归模型进行基因型与探针表达水平 (针对eQTL) 或甲基化 β 值 (针对mQTL) 之间的关联。所有关联均以性别和基因型数据中的前两个主要组分作为共同变量伴随基因型一起进行。使用200KB RNASET2 TSS

内的约200种遗传变体进行与RNASET2基因表达或甲基化水平的关联。

[0296] 候选调控性SNP的基序分析和鉴别

[0297] 使用bioconductor motifbreakR包(Coetzee等人,Bioinformatics2015;31:3847-9)分析表现eQTL和mQTL的所有变体以预测TF结合基序的破坏。只有使用来自CD患者的RNAseq数据鉴别为表达的T细胞特异性TF被进行下一步。然后基于Roadmap Epigenomics Mapping Consortium (REMC) 数据分析候选调控性SNP的潜在功能(Roadmap Epigenomics C.等人,Nature 2015;518:317-30)。基于组蛋白修饰H3K4me1与H3K27ac信号的重叠确定潜在的活性增强子区域(Coetzee等人,Hum Mol Genet2015;24:3595-607)。基于REMC CHIP-seq结合信号和Regulome数据确定TF调控的潜在功能。

[0298] 途径分析

[0299] 通过使用Qiagen Ingenuity®途径分析(IPA®,Qiagen,Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity)以及注释、可视化和整合发现数据库(DAVID,http://david.abcc.ncifcrf.gov)来完成途径分析。

[0300] 统计分析

[0301] 使用BRB阵列工具(brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools)和R程序(版本2.2.2; www.r-project.org)进行建模、数据分析和数据挖掘。基于0.001的最小p值,使用复合共同变量预测物、对角线性判别分析、k最近邻(使用k=1和3)、最近质心和支持向量机进行类别预测分析。使用Cluster 3.0和Java Treeview 1.1.6r4进行聚类分析。使用JMP统计软件(Cary,NC)确定针对统计学显著性的检验。通过参数学生T检验(Student's T test)和皮尔森相关性(Pearson correlation)来计算rs1819333和rs9355610SNP与治疗失败、ANCA血清阳性、肠切除长度和再次手术时间之间的临床关联的检验;使用Fisher精确检验和Kaplan-Meier生存曲线进行关联和趋势的检验。通过Cochran-Armitage趋势检验来计算与内镜检查复发的关联。

[0302] 结果

[0303] 在本研究中,发明人将RNASET2(一种BD易感基因)的下调鉴别为TL1A介导的细胞因子产生增强的组分,并且将其鉴别为疾病严重程度的新型潜在生物标志物。siRNA沉默后RNASET2的下调导致IFN- γ 分泌增加,不受任何特定理论约束,支持其在调节炎症反应中的作用。与每年无疾病发作的患者相比,在来自每年疾病发作一次或多次的CD患者的外周T细胞中也观察到了RNASET2表达降低。在功能上,数量性状基因座与外周和粘膜组织中RNASET2疾病风险变体的表达降低(eQTL)以及来自患有医学难治性而非轻度疾病的CD患者的DNA过度甲基化(mQTL)相关。此外,RNASET2疾病风险变体与狭窄性/穿透性疾病行为的发生增加相关。此外,RNASET2疾病风险变体与复杂/耐药性CD表型相关,该复杂/耐药性CD表型部分定义为治疗药物失败、ANCA血清阳性、肠切除长度增加、再次手术时间较短和具有高(>2) Rutgeerts评分的术后内镜检查。RNASET2疾病风险变体的基序筛选鉴别了在位于潜在增强子区域内的共有ETS-TF结合位点具有预测破坏的rs2149092,提供了对RNASET2顺式调节元件的见解。RNASET2与多种ETS转录因子的表达相关。最后,RNASET2的siRNA沉默导致IFN- γ 增强、ICAM1增加和伴随的T细胞聚集,而聚集的抗LFA1阻断抑制IFN- γ 分泌。

[0304] 与TL1A介导的IFN- γ 产生增强相关的差异基因表达的鉴别

[0305] 为了鉴别TL1A介导的IFN- γ 产生的增强所涉及的潜在分子途径,用TL1A处理关键

的IBD促炎细胞因子CD4⁺T细胞,将其分选为分泌IFN- γ 的亚组和不分泌IFN- γ 的亚组,并通过RNA-seq进行分析(图15和图27)。该组表达基因的无监督层次聚类将TL1A介导的分泌IFN- γ 的组和不分泌IFN- γ 的组清楚地区分开(图16)。鉴别了在分泌/不分泌IFN- γ 的亚组之间具有至少两倍差异表达(p 值 $<1 \times 10^{-5}$)的764个“预测物”基因(图17)。基因本体分析表明,差异表达的基因在与T细胞受体信号传导、细胞凋亡和RNA表达相关的途径中富集,并且该差异表达的基因是抗TNF生物药物英夫利昔单抗的下游靶标。与其他区域相比,预测物基因在GWAS鉴别的IBD易感性变体侧翼的区域(单核苷酸多态性(SNP)上游或下游0.25MB)中显著富集(14%与9%, p 值为 3.3×10^{-6} ,超几何检验)。不受任何特定理论约束,这些数据表明这些基因不仅有助于TL1A介导的IFN- γ 表达的调控,还与IBD风险相关基因座重叠。在IBD风险相关的预测物基因中,IFN- γ 的表达被确认是最显著上调的,而RNASET2被确认是最显著下调的基因(图20)。RNASET2是唯一在分泌IFN- γ 的CD4⁺亚组中具有超过5倍下调的IBD风险相关基因。

[0306] 表现出表达与重叠疾病风险相关变体区域侧翼的DNA甲基化水平逆相关的RNASET2区域

[0307] RNASET2是核糖核酸酶Rh/T2/S家族中唯一的人类成员,其在卵巢癌、黑素瘤和非霍奇金淋巴瘤中的表达降低。考虑到IFN- γ 在克罗恩病/IBD的发病机制中的关键作用,不受任何特定理论约束,这些数据共同表明RNASET2的下调鉴别TL1A介导的“严重”CD。在来自NL、CD和UC患者的单独队列的新鲜分离的、未刺激外周CD3⁺T细胞中检查RNASET2表达。由于DNA甲基化被理解为影响基因表达的机制之一,特别是在映射到转录外显子组之外的疾病相关遗传变体中,我们检查了RNASET2基因座上的DNA甲基化状态。RNA-seq分析证明TNFSF15表达水平与来自两个独立队列的外周T细胞中的RNASET2之间存在逆相关,该两个独立队列由共138名CD患者组成(图24A和图24D)。即使分别分析每个队列,这些结果也是一致的(图24B和图24C)。此外,表达与甲基化之间存在显著的负相关(图23),主要在转录起始位点(TSS)上游和下游50kb内。在RNASET2的第一内含子内的CpG位点(1.4kb)处观察到甲基化与表达的最强相关性($p=8.5 \times 10^{-5}$)(图26)。此外,CD疾病遗传风险变体与甲基化和表达水平相关的区域重叠(图10),该CD疾病遗传风险变体包括在欧洲血统群体rs1819333中标记RNASET2基因座的IBD风险SNP。

[0308] RNASET2疾病风险等位基因与患有难治性疾病的CD患者的RNASET2表达降低和DNA甲基化增加相关

[0309] 进行基因表达数量性状(eQTL)以表征RNASET2基因变异与基因转录物表达水平之间的功能相关性。与欧洲人rs1819333和韩国人rs2149085中的疾病相关IBD风险SNP以及格雷夫斯病rs9355610相关的风险SNP位于距RNASET2转录起始位点-13kb处。在从患有难治性疾病的IBD患者分离的未刺激外周CD3⁺T细胞中建立RNASET2 IBD风险基因型与基因转录物表达水平之间的功能相关性。数据证明,来自携带RNASET2风险等位基因rs2149085、rs1819333和rs9355610的受试者的T细胞中RNASET2的表达显著降低(图11)。通过在手术切除时从CD受试者获得的未发炎小肠组织中提取的mRNA观察到的显著eQTL确认了这些发现(图12)。还检查了RNASET2基因变异与甲基化、mQTL之间的相关性。随着患有难治性疾病的CD患者中甲基化的增加,观察到显著的mQTL(图13A和图13C)。相反,在从患有轻度疾病的CD患者或NL受试者分离的细胞中未检测到mQTL(图13B和图13D)。此外,存在复杂疾病行为狭

窄性/穿透性表型(蒙特利尔分类B1与B2和B3)的显著增加,该显著增加与携带RNASET2疾病风险SNP的CD患者相关(rs1819333/rs2149085 $p=0.05$,rs9355610 $p=0.01$)。

[0310] 基因表达(eQTL)和DNA甲基化(mQTL)对跨越RNASET2基因座的所有信息性SNP进行映射(LD图)。在从患有医学难治性疾病的患者分离的T细胞中,从RNASET2 TSS下游10kb到上游-170kb存在强烈重叠的eQTL和mQTL,跨越成纤维细胞生长因子受体1癌基因伴侣(FGFR10P)至趋化因子(C-C基序)受体6(CCR6)的第一内含子。同样,在将未刺激的外周T细胞的RNASET2表达与患有难治性疾病的CD患者的小肠手术切除进行比较时,存在eQTL重叠。相反,在患有轻度疾病的CD患者或NL受试者中几乎未检测到mQTL关联(图14A和图14B)。未检测到FGFR10P或CCR6的eQTL关联。这些数据在从患有医学难治性疾病的CD患者分离的外周T细胞单独队列中进一步得到验证。与CD相关的RNASET2风险变体与相应的eQTL之间存在显著重叠(图28),不受任何特定理论约束,这表明了RNASET2在介导疾病中的功能性作用。CD中RNASET2的减弱表达

[0311] 为了确定RNASET2在IBD发病机制中的作用,检查从IBD患者分离的CD4⁺T细胞中RNASET2表达的调控,并在TL1A存在或不存在情况下将该调控与正常(NL)供体进行比较。如图7所示,NL供体而非IBD患者表现出TL1A介导的RNASET2表达水平降低。相反,与每年无疾病发作的患者相比,在患有更严重疾病(表现出每年疾病发作一次或多次)的CD患者中发现RNASET2的表达水平降低(图8A和图8C)。

[0312] RNASET2疾病风险等位基因与复杂和耐药性疾病行为相关

[0313] 为了评价RNASET2与疾病活动和严重程度之间的关联,发明人使用了564名CD患者的队列,这些患者已经经历了手术切除,随后进行了前瞻性随访。评估包括手术适应症在内的临床特质与RNASET2风险变体(rs1819333和rs9355610)的关联。RNASET2疾病风险变体SNP与复杂的狭窄性/穿透性表型(蒙特利尔分类B1与B2和B3)相关(表18)。在手术时,具有RNASET2疾病风险变体SNP的患者与巯基嘌呤或抗TNF疗法的治疗失败、ANCA血清阳性(与缺乏对抗TNF疗法的应答相关的标志物)和由于整体疾病严重程度引起的肠切除长度增加相关(表18和图38-图39)。对于类固醇或柳氮磺胺吡啶的治疗失败未观察到关联。此外,具有RNASET2疾病风险变体SNP且需要多次切除以进行疾病管理的患者表现出较短的再次手术时间(图32)。

[0314] 表18:与RNASET2风险变体相关的临床疾病参数。

		rs1819333		rs9355610	
临床参数		<i>p</i>	OR	<i>p</i>	OR
疾病行为					
[0315]	B2 与 B1 ^a	ns	ns	0.041	1.07
	B3 与 B1 ^a	ns	ns	0.056	1.06
	B2、B3 与 B1 ^a	0.051	1.05	0.016	1.07
	巯基嘌呤治疗失败 ^b	0.009	1.68	0.019	1.75
	抗 TNF 治疗失败 ^b	0.039	1.46	0.042	1.56
	ANCA 血清阳性 ^b	0.009	2.24	0.047	2.07
	切除段> 30 cm ^b	ns	ns	0.004	2.13
	>40 cm ^b	ns	ns	0.031	1.96
内镜检查复发 Rutgeert 评分 3-4		<i>p</i>	<i>z</i> 评分	<i>p</i>	<i>z</i> 评分
与 1-2					
[0316]	无预防性药物 ^b	0.025	2.24	0.024	2.25

[0317] ^aIIBDGC队列CD (n=3345) /病例对照 (n=6277)

[0318] ^b已经接受手术切除并进行前瞻性随访的CD患者 (n=584)。

[0319] 同样,RNASET2风险SNP与更严重的疾病复发相关。术后内镜检查揭示了在未接受术后预防的分类为高Rutgeerts评分 (>2) 的患者中RNASET2风险SNP的相关性 (表18)。针对临床复发未观察到相关性。RNASET2的表达下降也与穿透性疾病表型 (图31) 和ASCA血清阳性 (图30) 相关。不受任何特定理论约束,该数据支持RNASET2疾病风险SNP与指示复杂和耐药性疾病的行为的临床参数的关联。

[0320] LD中具有疾病标记SNP的RNASET2变体破坏ETS转录因子结合基序

[0321] 以上提出的数据证明了超过百种CD RNASET2风险变体之间的显著重叠,其中许多重叠处于连锁不平衡,与eQTL和mQTL相关,从而在确定功能/因果关系方面造成困难。由于与CD相关的大多数RNASET2风险变体位于非编码区内,因此这些SNP可能通过调节调控功能来改变表达。此外,不受任何特定理论约束,研究表明疾病相关SNP通常存在于与疾病相关的细胞类型的活性增强子区域内,并可破坏TF结合基序。REMC数据证明,与其他组织相比,通过假定的活性增强子组蛋白修饰和活性基因表达,RNASET2基因座在初级T细胞中很显著 (图40)。为了深入了解调控RNASET2表达的分子途径并对多个候选功能性SNP按优先级排序,发明人进行了基序分析以预测与eQTL/mQTL相关的所有SNP的TF基序破坏。选择破坏T细胞中表达的TF基序的变体,并关注LD中具有RNASET2疾病指数SNP rs1819333的候选变体。位于距索引SNP (LD R²=1) -569bp的rs2049092SNP疾病风险变体位于高度保守TTCC基序内,被大多数ETS转录因子利用,预测其会破坏TF结合。序列分析证明了IRF4与邻近JUN结合

位点的Spi1结合位点的重叠(图36A)。Regulome和REMC数据确认了类淋巴瘤细胞系中的ETS1、IRF4和Spi1结合的TF占据(图36B),该TF占据与指示活性增强子元件的组蛋白修饰重叠。此外,RNASET2的表达与ETS和JUN TF的多个成员之间存在强相关性(图36C和图41)。针对IRF4未观察到相关性(图41)。不受任何特定理论约束,这些数据增强了免疫隔室中RNASET2表达的相关性,并支持ETS和JUN转录因子在调控RNASET2转录中的功能性作用。RNASET2的沉默经由ICAM1表达上调和同型T细胞聚集来增强IFN- γ 分泌使用siRNA沉默测试RNASET2在调控IFN- γ 分泌中的功能性作用。用靶向RNASET2 mRNA的siRNA转染CD4⁺T细胞,然后用TL1A进行刺激。用靶向RNASET2的siRNA转染的细胞显示对RNASET2表达的60%-70%抑制(图21A和图37A),并且与对照siRNA相比,在TL1A介导的IFN- γ 分泌中观察到平行的显著增强(>1.5倍)(图21B和图37B)。不受任何特定理论约束,这些数据表明RNASET2的下调调控IFN- γ 表达。

[0322] 为了确定该过程中涉及的信号传导途径,进行了蛋白质组学分析。在比较分泌IFN- γ 的T细胞和不分泌IFN- γ 的T细胞时,在同时表现出siRNA沉默RNASET2后表达调控以及TL1A介导的差异表达的基础上选择候选靶标(数据来自RNAseq分析)。与不分泌IFN- γ 的T细胞相比,响应于RNASET2沉默且在分泌IFN- γ 的T细胞中上调的蛋白质之一为ICAM1(图42)。ICAM1最近被鉴别为IBD易感性基因座,具有与疾病风险变体相关的上调基因表达。ICAM1为通常由血管内皮和白细胞表达的跨膜黏附蛋白。ICAM与T细胞上的LFA1受体的结合促进并稳定细胞-细胞相互作用。研究已经证明,经激活的T细胞上ICAM1的表达增加,并提出了ICAM1-LFA1结合在诱导同型T细胞聚集和随后的T细胞分化中的作用。为了检查细胞-细胞接触对TL1A介导的IFN- γ 分泌的影响,在平底微孔和锥底微孔中温育细胞。当细胞以紧密的细胞-细胞锥形几何结构温育时,一致观察到IFN- γ 产生增加超过3倍(数据未示出)。然后使用流式细胞术检验同型T细胞聚集促进TL1A介导的IFN- γ 产生增强的假设。简言之,在存在或不存在TL1A的情况下刺激T细胞,然后用抗体对细胞内IFN- γ 进行染色(图37C和图37D,左图)并使用碘化丙锭(PI)对细胞聚集进行染色(图37C和图37D,上图和右下图)。PI标记的峰对应于允许鉴别单个细胞与细胞聚集体的每个事件的细胞数。每个直方图中的第一个峰对应于单细胞事件(黑色组)而连续峰对应于多细胞聚集体(灰色组)。仅有小部分未刺激的T细胞分泌IFN- γ ,并且这些细胞几乎均匀分布到单细胞事件和细胞聚集体(图37E,左图)。在TL1A刺激后,细胞聚集体的百分比和大小(图37C的右上图与图37D相比)以及产生IFN- γ 的细胞的总数(6倍)(图37E和图37F)均显著增加,并且IFN- γ 分泌增加30倍(数据未示出)。相反,大多数不产生IFN- γ 的T细胞由单细胞事件组成,与该T细胞是否存在TL1A刺激的情况下培养无关(图37E,右图)。不受任何特定理论约束,这些结果表明细胞聚集可同时有助于产生IFN- γ 的细胞数和IFN- γ 产生总量的增加,并且TL1A刺激可增强该过程。使用LFA-1阻断抗体测试TL1A在经由ICAM1-LFA1接合介导细胞聚集中的功能性作用。如图37G所示,与IgG对照抗体相比,响应于阻断LFA-1接合的IFN- γ 分泌总体减少43%(p值=0.047)。不受任何特定理论约束,这些数据共同表明TL1A介导的RNASET2下调和伴随的ICAM1表达增强促进了同型T细胞聚集和IFN- γ 产生的增加。值得注意的是,ICAM1表达的增加与具有ASCA血清阳性以及抗TNF和巯基嘌呤的术前治疗失败(图43)的CD相关,这些临床参数与降低的RNASET2和疾病活动性相关。

[0323] 实施例6

[0324] 已在201GWAS IBD易感性基因座中鉴别了RNASET2和TNFSF15。由TNFSF15编码的蛋白TL1A是粘膜炎症的关键中介物。升高的TL1A水平与TNFSF15基因型和疾病严重程度相关。发明人已确定TL1A下调了T细胞中RNASET2的表达。TNFSF15和RNASET2表达在来自CD患者的T细胞中逆相关($p=5 \times 10^{-16}$)。检查了RNASET2作为IBD预后生物标志物的潜力。

[0325] 通过检查来自经历手术($n=21$)患者的外周T细胞和小肠手术样品($n=85$)中的表达数量性状基因座和甲基化数量性状基因座(eQTL/mQTL)来分析RNASET2疾病相关SNP在IBD中的作用。对接受过手术切除的CD患者进行前瞻性随访($n=584$)。评估包括手术适应症在内的临床特征与RNASET2风险变体(rs1819333和rs9355610)的关联。

[0326] 与对IBD疗法有应答的患者($n=16$)相比,需要手术干预以进行疾病管理的患者中的RNASET2疾病相关SNP与外周和粘膜组织中的RNASET2表达(eQTL)降低($p<0.001$)以及DNA过度甲基化(mQTL)降低($p<0.001$)相关。RNASET2疾病相关SNP与巯基嘌呤疗法($p=0.02$, OR=1.7)或抗TNF疗法($p=0.04$, OR=1.59)的治疗失败、ANCA血清阳性(与缺乏对抗TNF疗法的应答相关的标志物)($p=0.02$, OR=2.27)和肠切除总长度增加($>30\text{cm}$, $p=0.004$, OR=2.13/ $>40\text{cm}$, $p=0.03$, OR=1.96)相关。仅有RNASET2疾病相关SNP的患者表现出较短的再次手术时间($p=0.04$, z 评分=2.16)。具有高Rutgeerts评分(>2)的术后内镜检查($n=369$)与未接受术后预防($p=0.02$, z 评分=2.56)或单独使用抗TNF疗法($p=0.03$, z 评分=2.46)的患者的RNASET2风险SNP相关,而在接受其他IBD疗法的患者中未检测到关联。

[0327] 本研究确定了与临床相关疾病行为相关的RNASET2疾病相关SNP的功能性结果。RNASET2风险SNP与指示复杂和耐药性疾病行为的临床参数相关。此外,手术后对治疗的应答和疾病的复发与RNASET2风险SNP相关。不受任何特定理论约束,这些结果与我们先前的发现共同表明RNASET2的调控可以是由TL1A触发的疾病病理学的基础,并充当鉴别对当前治疗策略无应答的可受益于替代治疗途径的受试者的疾病生物标志物。

[0328] 实施例7

[0329] 表19:与RNASET2疾病风险SNP相关的临床特征

	rs1819333		rs9355610	
	<i>p</i>	OR	<i>p</i>	OR
手术时的CD表型				
巯基嘌呤治疗失败	0.009	1.68	0.019	1.75
[0330] 抗TNF治疗失败	0.039	1.46	0.042	1.59
ANCA血清阳性	0.009	2.24	0.047	2.07
切除段长度 $>30\text{cm}$			0.004	2.13
$>40\text{cm}$			0.031	1.96
家族病史	0.030	1.58	0.030	1.78
[0331] 接受过手术切除并进行前瞻性随访的CD患者($n=584$)				
B2与B1			0.041	1.07
[0332] B3与B1			0.056	1.06
B2、B3与B1	0.051	1.05	0.016	1.07

[0333] IIBDGC组CD($n=7173$)/病例对照($n=6278$)

[0334] 表20:内镜检查复发

[0335]	内镜检查评分	定义	3年临床复发率 (%)
	0	无病变	5
	1	≤ 口疮性病变	5
	2	病变之间具有正常粘膜的口疮性病变, 或较大病变的跳跃区, 或限于回肠结肠吻合术的病变	15-20
	3	弥漫性口疮性回肠炎伴弥漫性发炎的粘膜	40
	4	已有较大的溃疡、结节和/或变窄的弥漫性炎症	90

[0336] 改编自Remedica Journals

[0337]	手术后	rs9355610	
	内镜检查复发Rutgeert评分3-4与1-2	p	z评分
	无预防性药物	0.040	2.25
	单独抗TNF	0.016	2.69

[0338] rs2149092 (C-非风险等位基因/T-风险等位基因) 风险SNP消除了IRF4/PU.1/ELF-1结合位点。IRF4为IBD易感性SNP, 是淋巴细胞特异性的并且对于Th1、Th2、Th9、Th17和Treg亚组的分化至关重要。ELF-1为日本人群中的CD易感性SNP。它是在淋巴样细胞中表达的ETS家族转录因子, 同时充当表达的增强子和抑制子, 并且参与IL2和IL23信号传导。PU.1也是ETS家族转录因子, 并且对T细胞发育的早期阶段至关重要。它下调存在于粘膜中并在先天免疫中起作用的 $\gamma\delta$ T细胞, 并且当在 T_H9 细胞中表达时, 这些细胞经由肠上皮细胞中的IL-9受体信号传导来驱动T细胞介导的结肠炎。

[0339] 分泌IFN- γ 的CD4+T细胞中, TL1A处理后RNASET2是表达降低, 并且RNASET2的沉默增强TL1A介导的IFN- γ 分泌。RNASET2疾病相关SNP的临床相关性也已被鉴别, 该临床相关性包括但不限于巯基嘌呤疗法的治疗失败、抗TNF疗法的治疗失败、ANCA血清阳性、B2/B3与B1 (结构化/穿透性与非穿透性/非狭窄性) 疾病、肠切除长度增加、第二次手术时间缩短和具有高Rutgeerts评分的内镜检查疾病复发。

[0340] 以上在具体实施方式中描述了本发明的各个实施方案。虽然这些描述直接描述了上述实施方案, 但应理解, 本领域的技术人员可以想到对本文示出和描述的具体实施方案的修改和/或变化。落在这种描述的范围内的任何这样的修改或变化也意图包括在其中。除非特别指出, 否则发明人意在赋予说明书和权利要求中的词语和短语对于适用领域的普通技术人员普通且惯用的含义。

[0341] 已经呈现了本申请人在提交本申请时已知的本发明的各个实施方案的以上描述, 并且旨在用于说明和描述的目的。本发明的描述并非意在穷尽, 也并非将本发明限制于所公开的精确形式, 并且根据上述教导可以进行许多修改和变化。所描述的实施方案用于解释本发明的原理及其实际应用, 并且使本领域的其他技术人员能够在各个实施方案中利用本发明以及适合于预期的特定用途的各种修改。因此, 意在表明本发明不限于所公开的用于实施本发明的特定实施方案。

[0342] 虽然已经示出并描述了本发明的特定实施方案, 但对于本领域技术人员来说显而

易见的是,基于本文的教导,在不脱离本发明及其更广泛的方面的情况下可以进行改变和修改,因此所附权利要求旨在将所有这些改变和修改都涵盖在其范围内并涵盖在本发明的真实精神和范围内。本领域技术人员将理解,通常情况下,本文使用的术语一般意指“开放性”术语(例如,术语“包括”应被解释为“包括但不限于”,术语“具有”应被解释为“至少具有”,术语“包含”应被解释为“包含但不限于”等)。

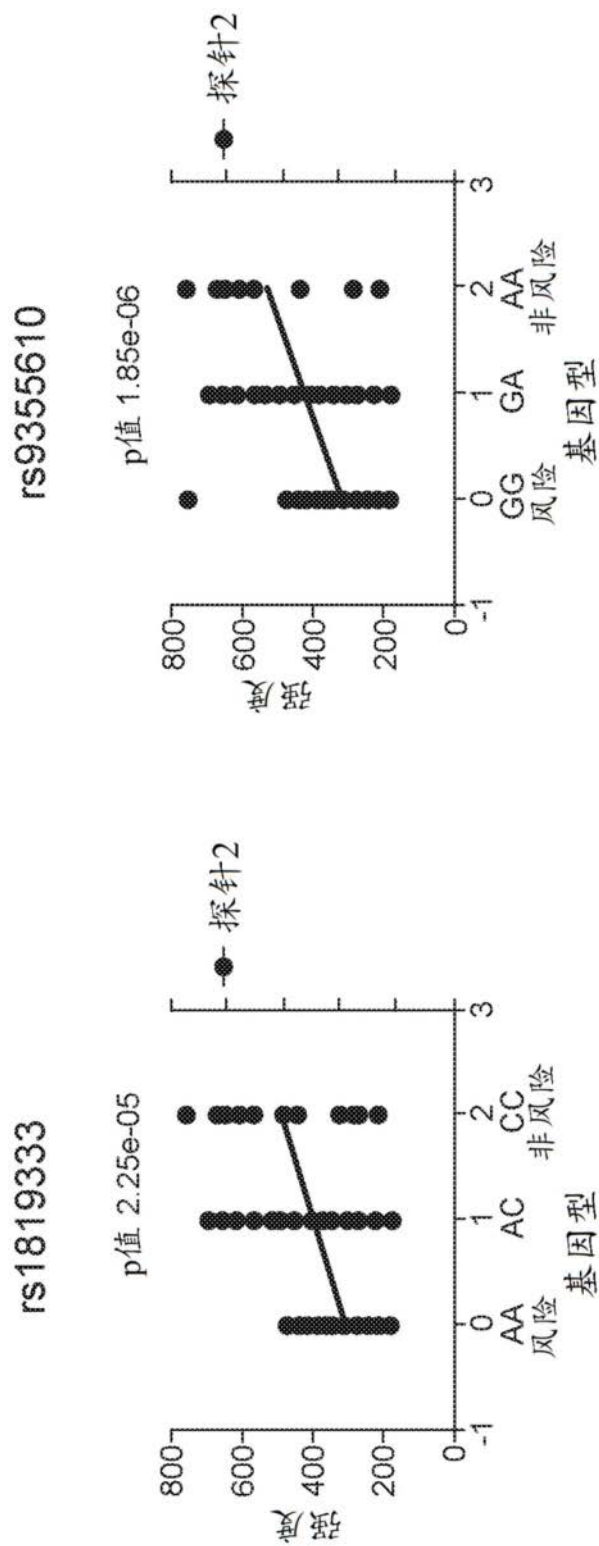


图1

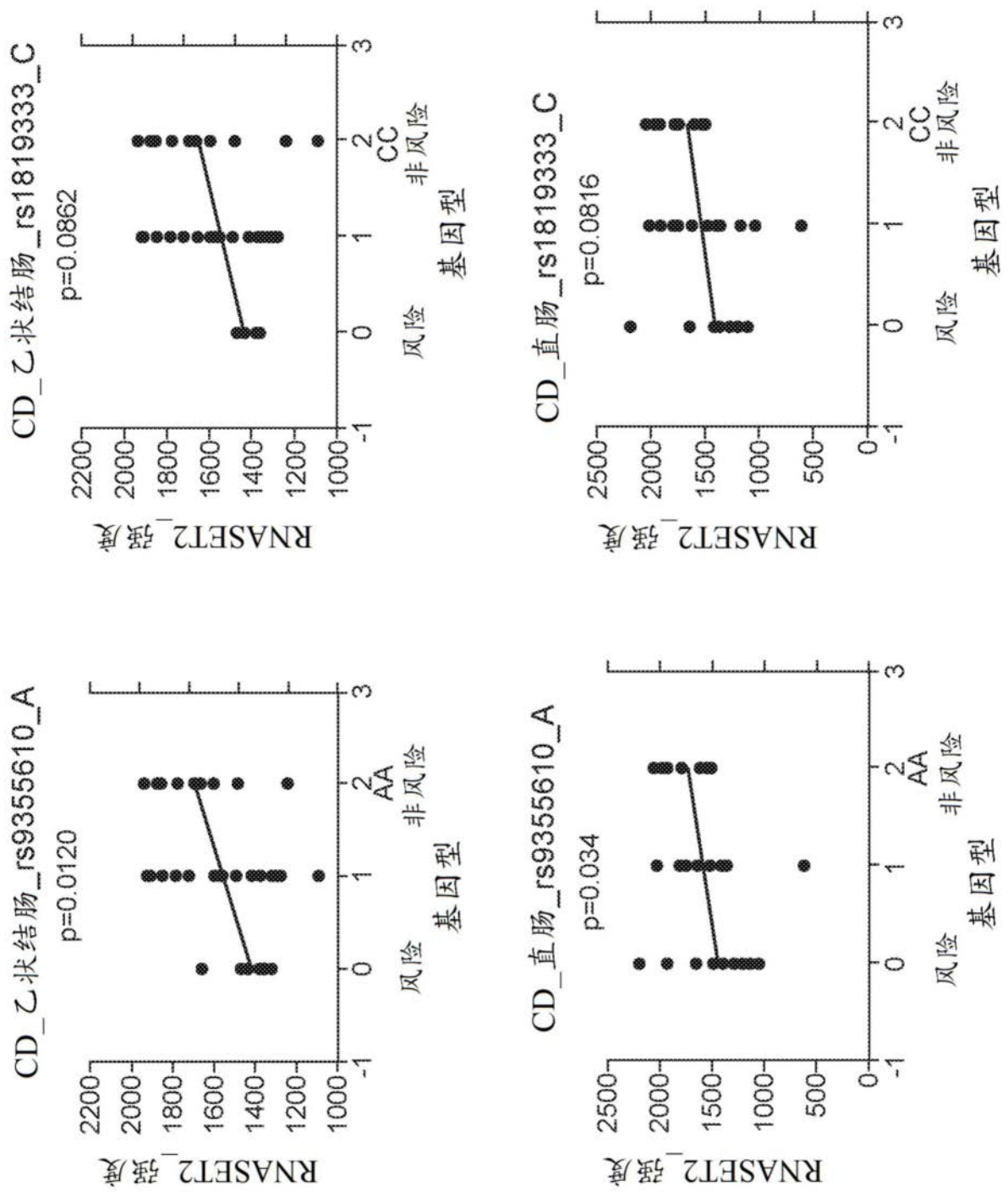


图2

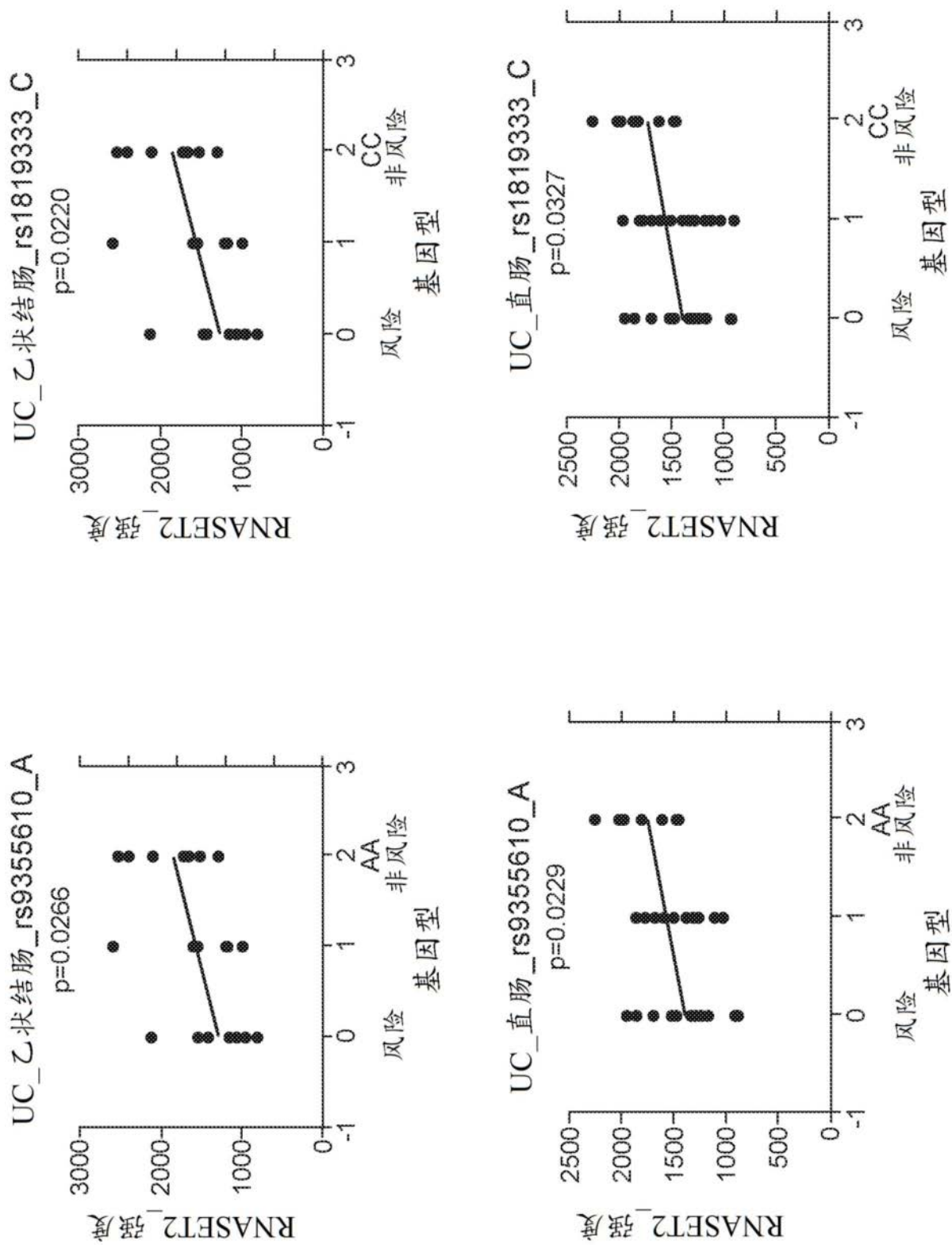


图3

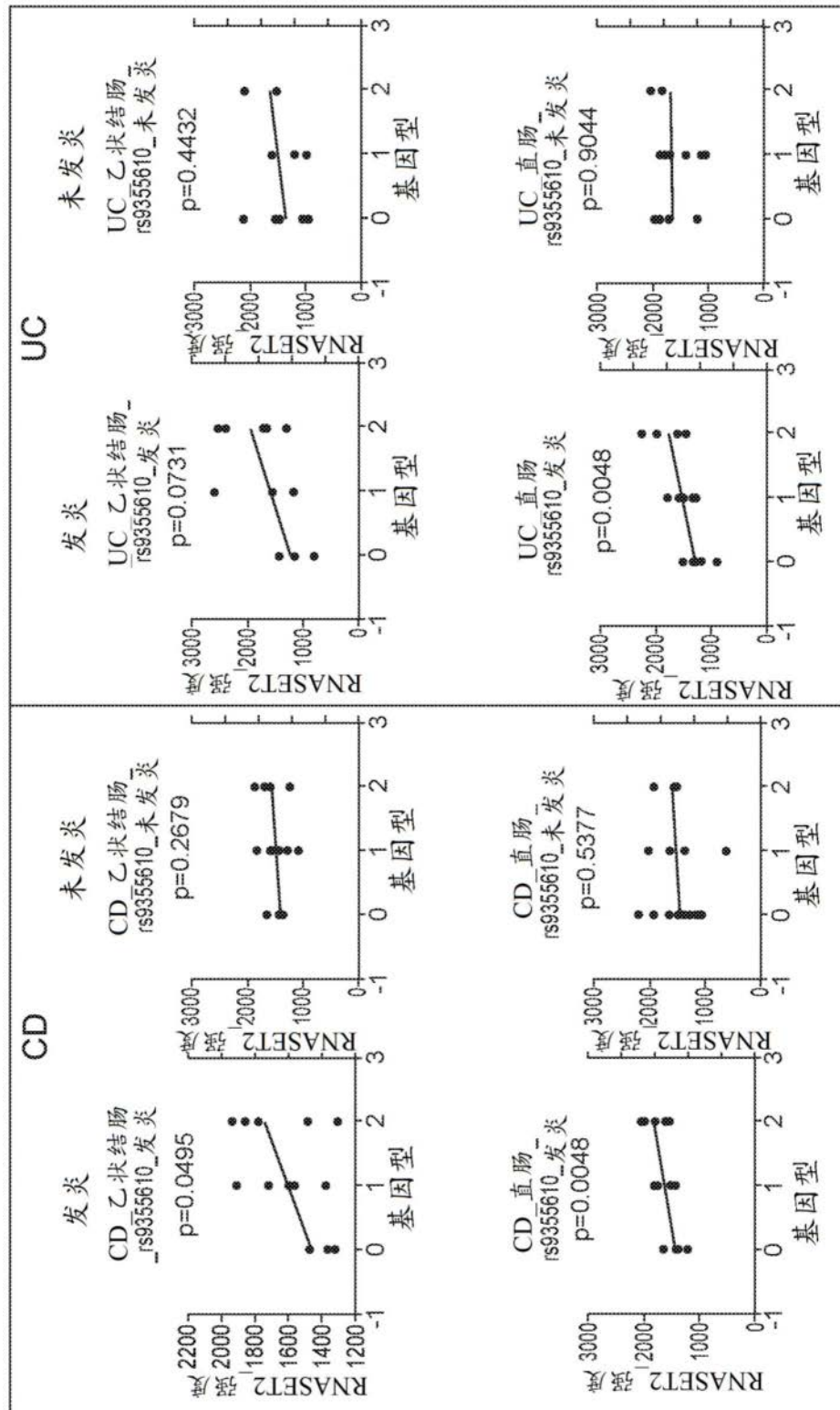


图4

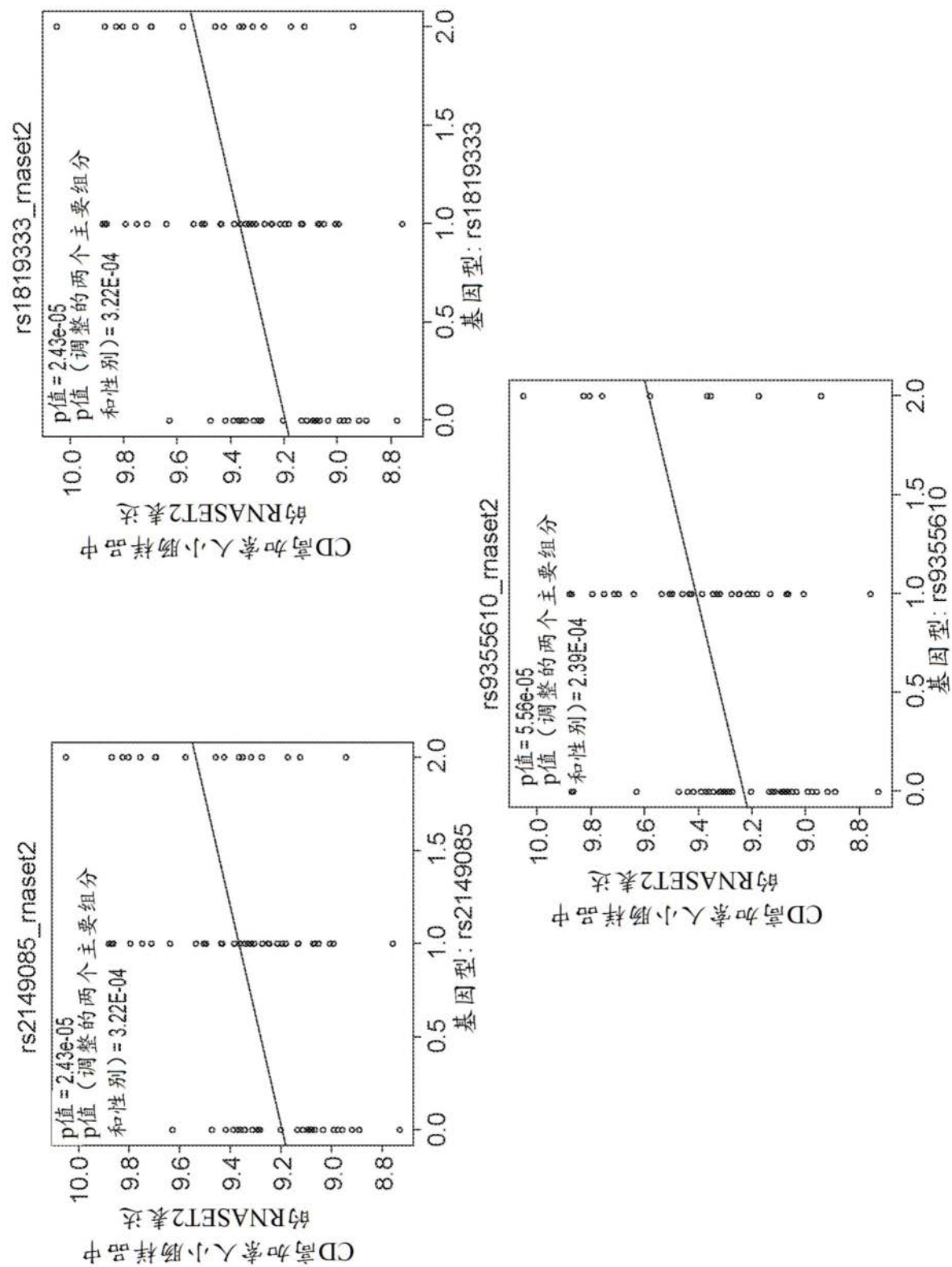


图5

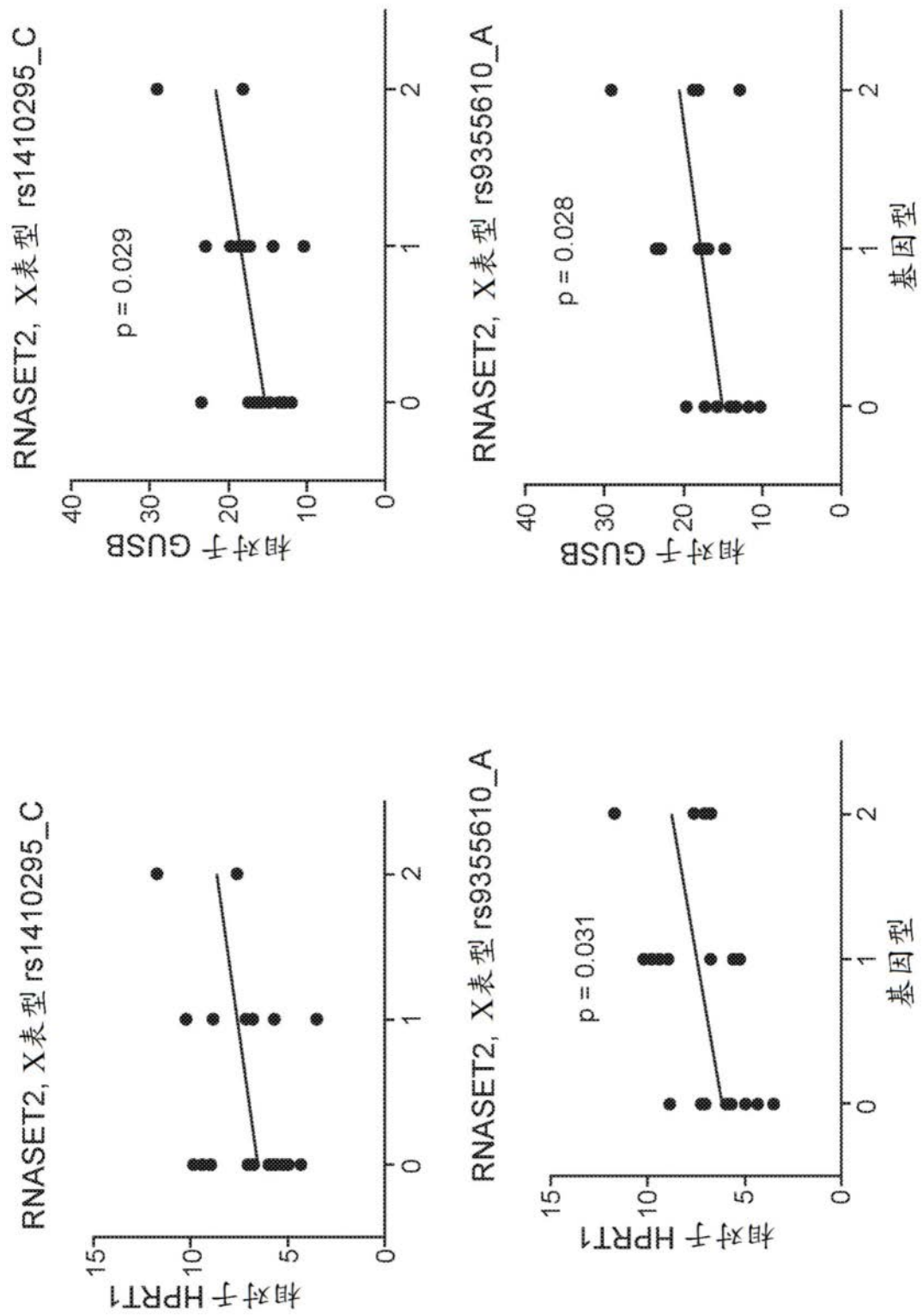


图6

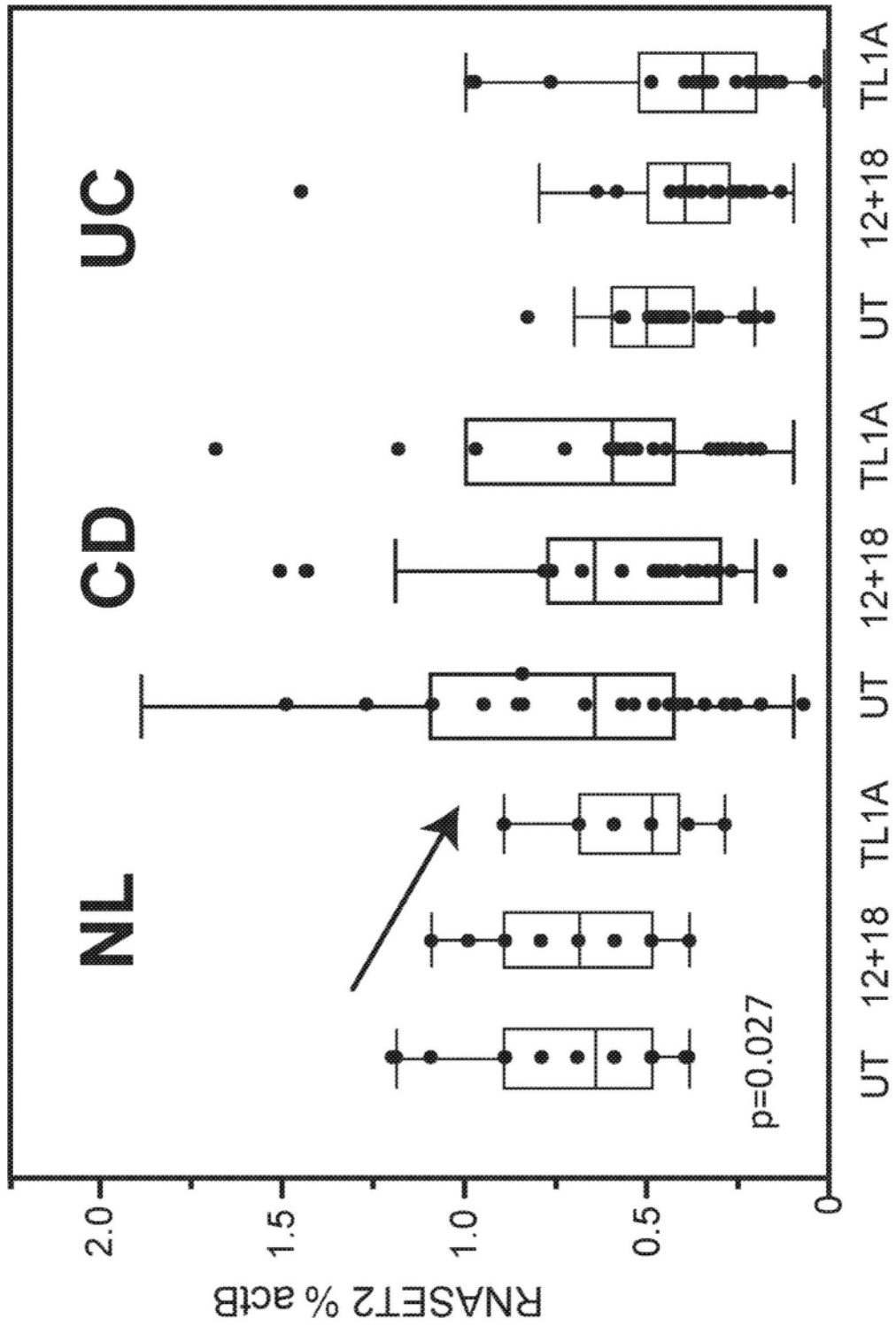


图7

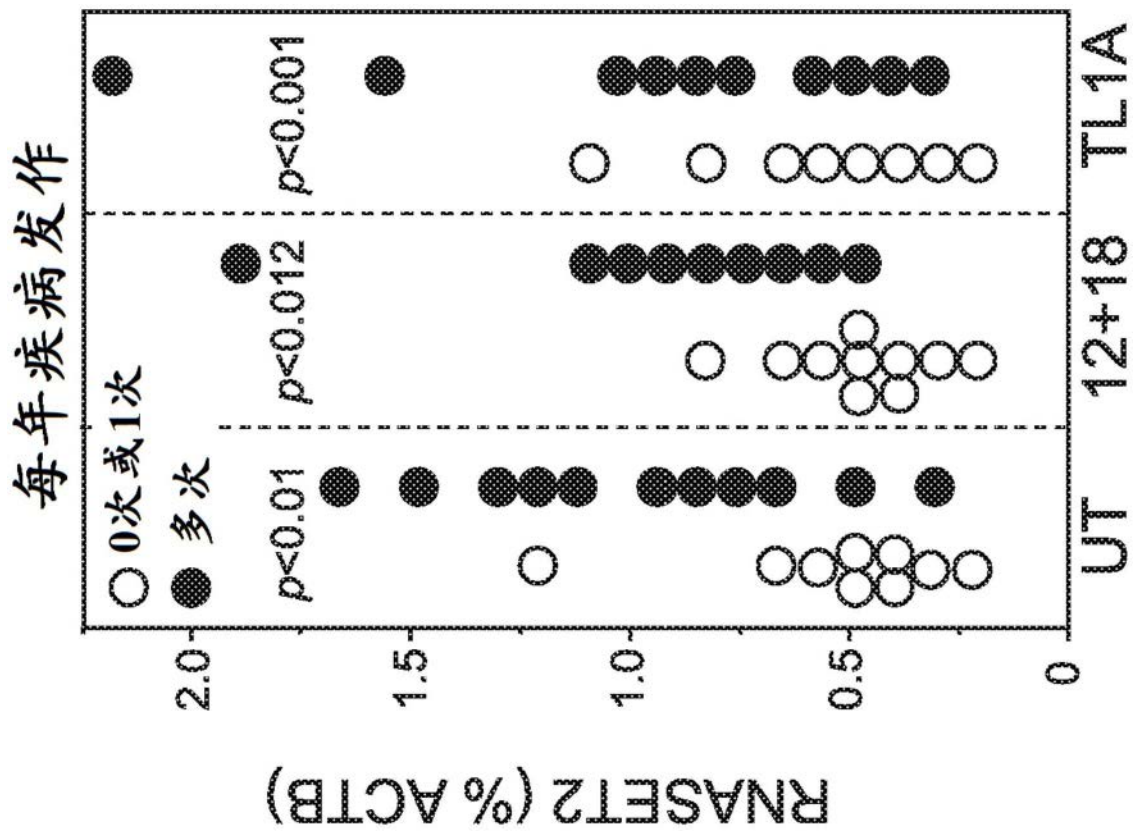


图8A

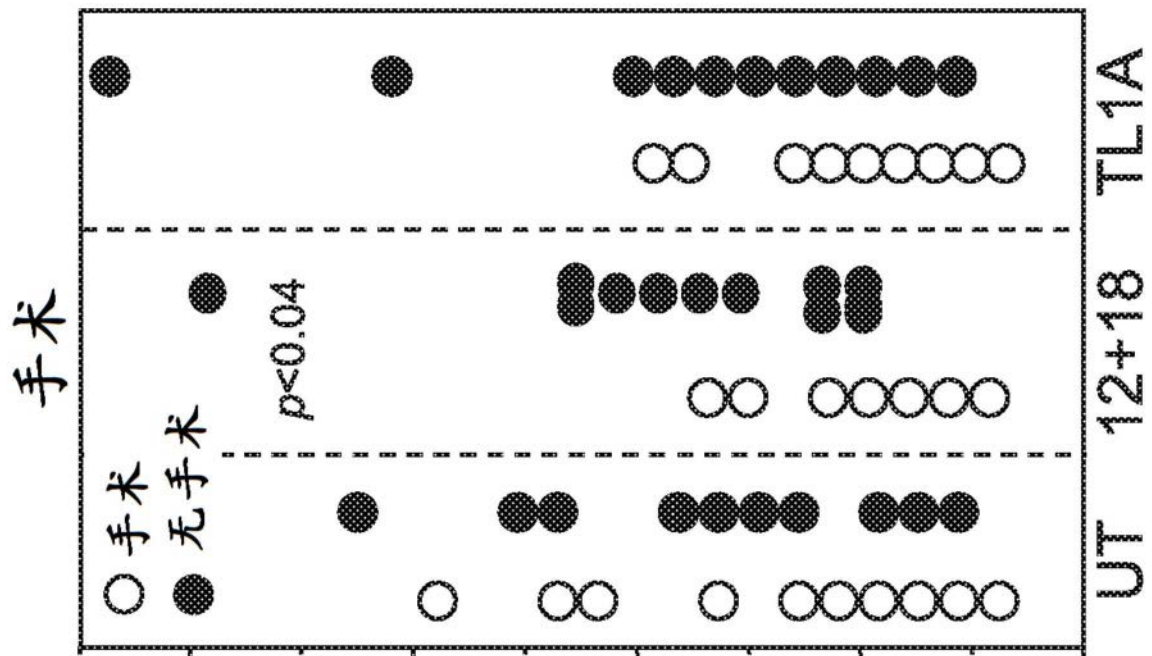


图8B

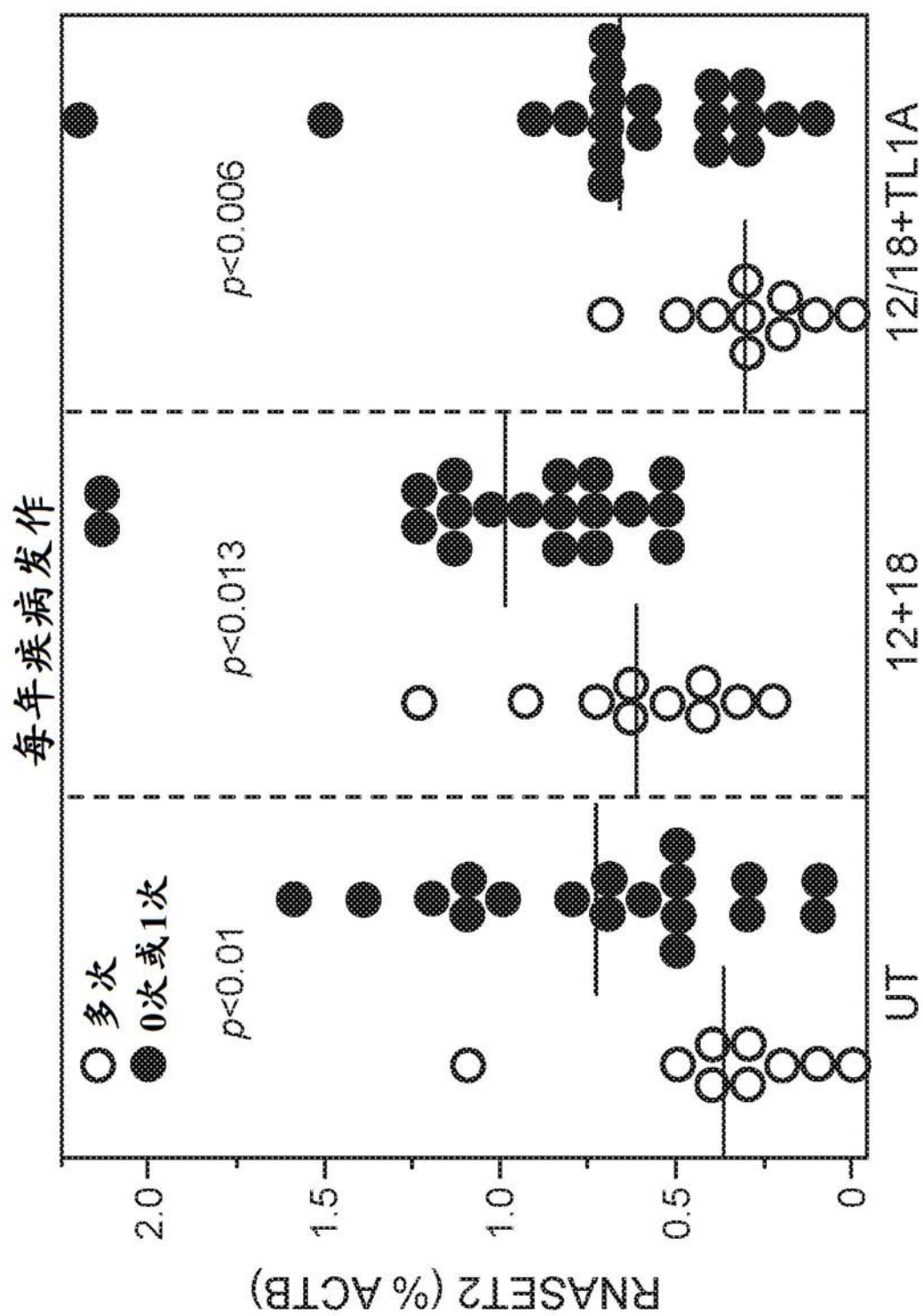


图8C

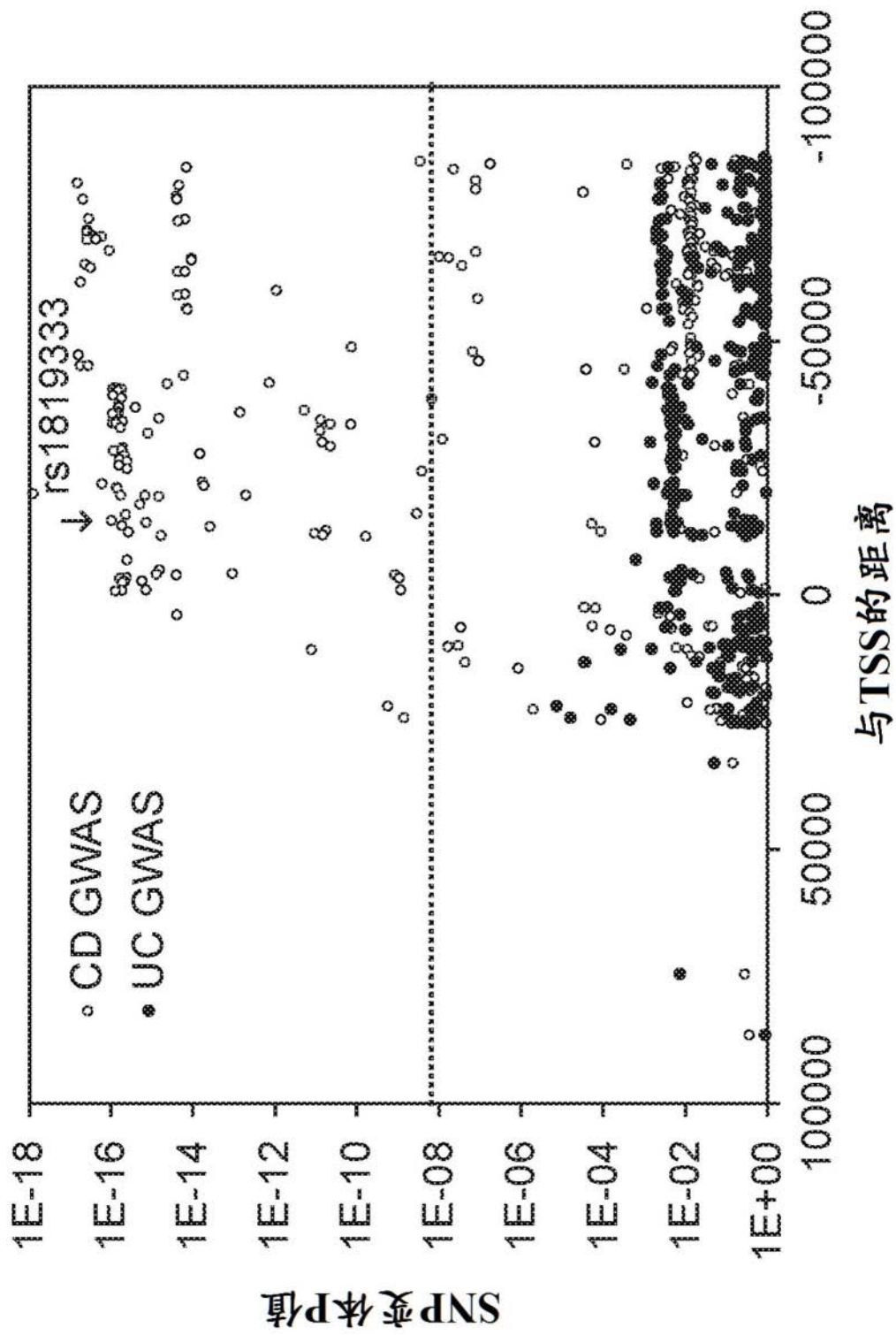


图10

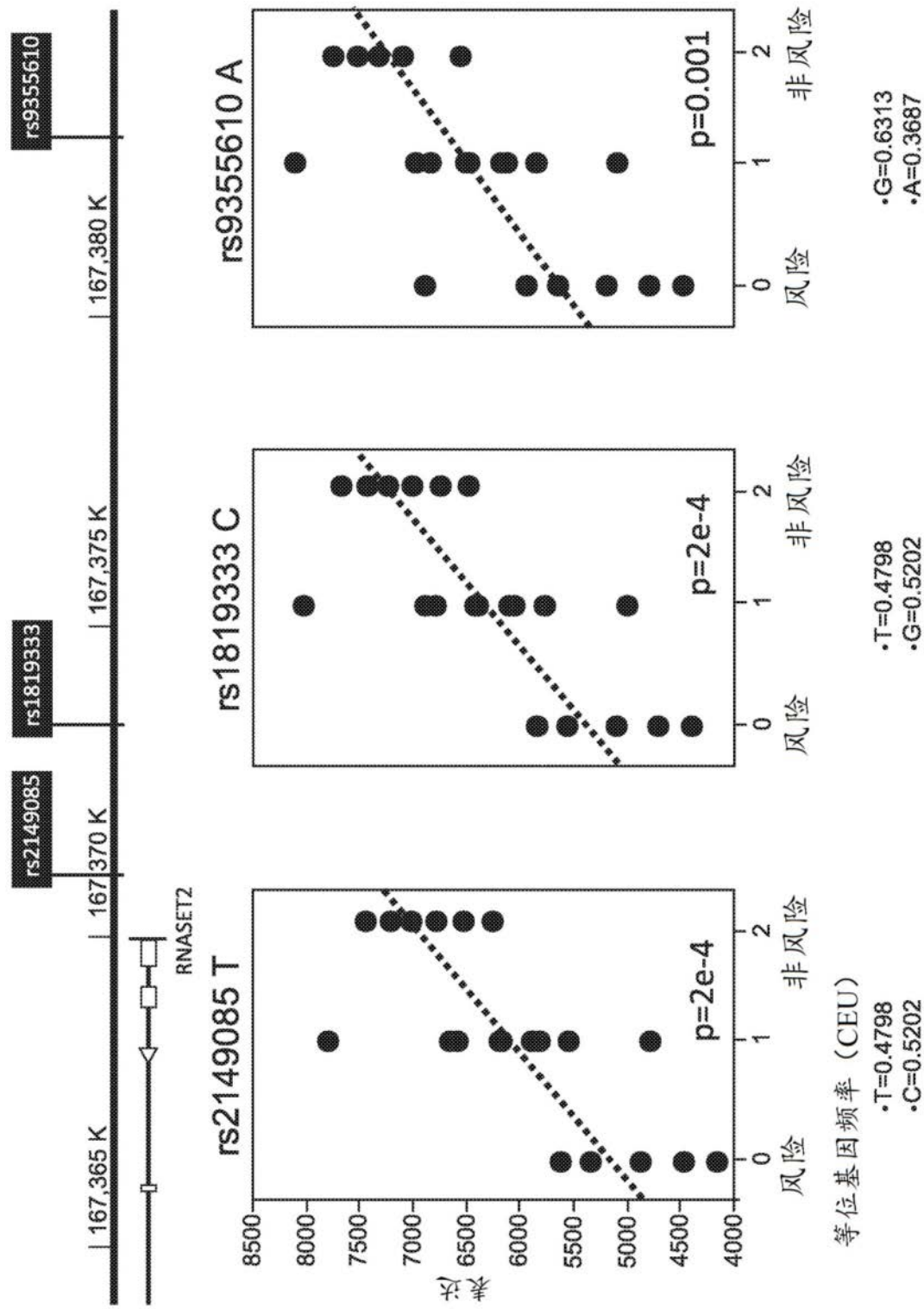


图11

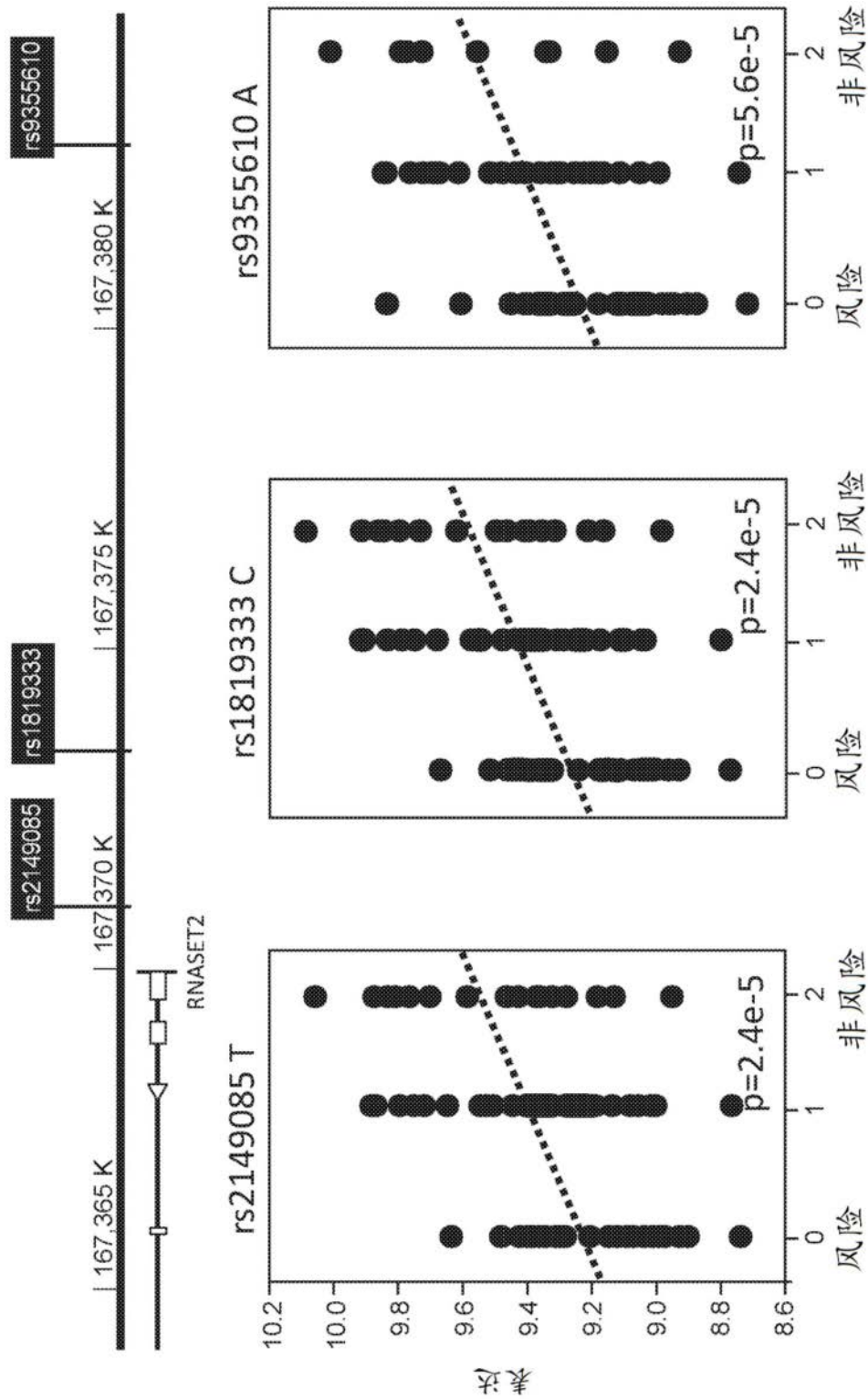


图12

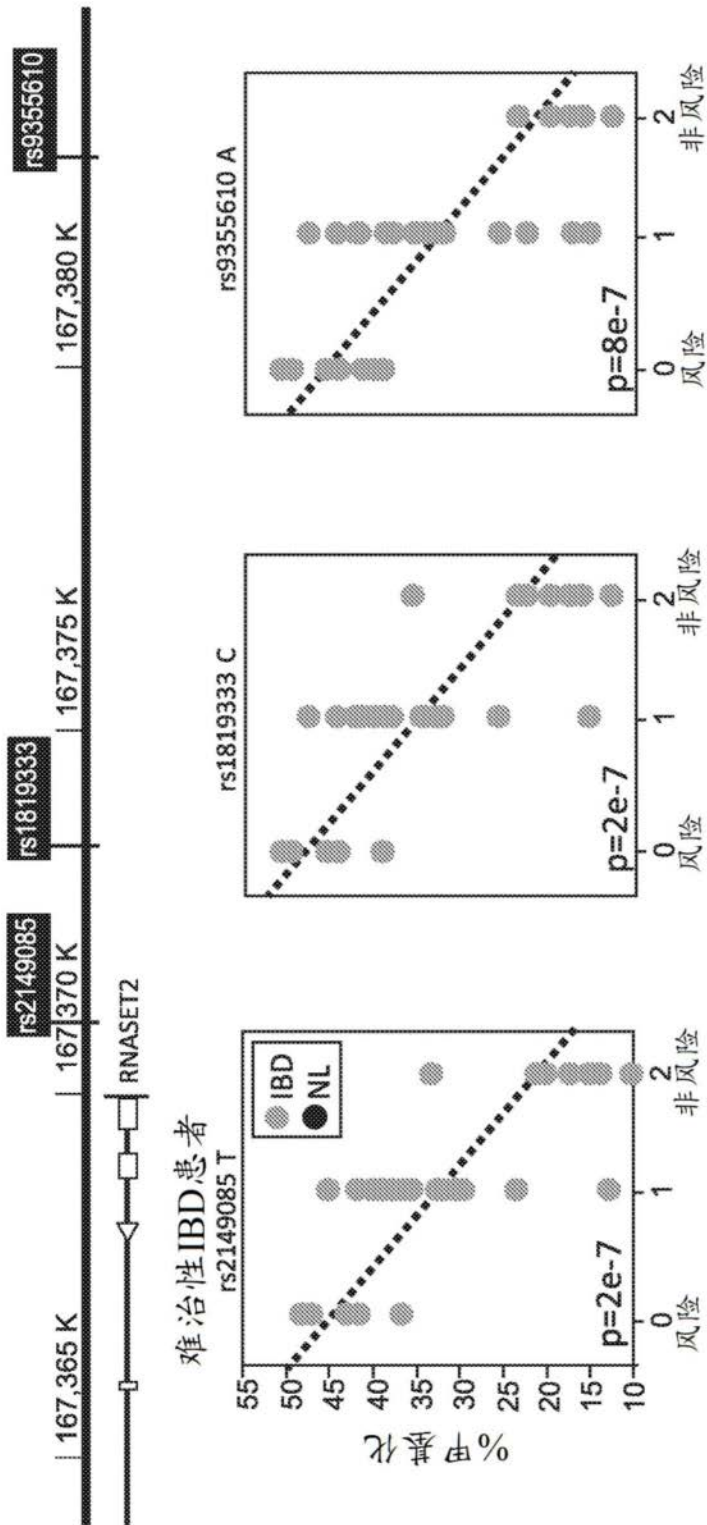


图 13A

正常或患有轻度疾病的患者

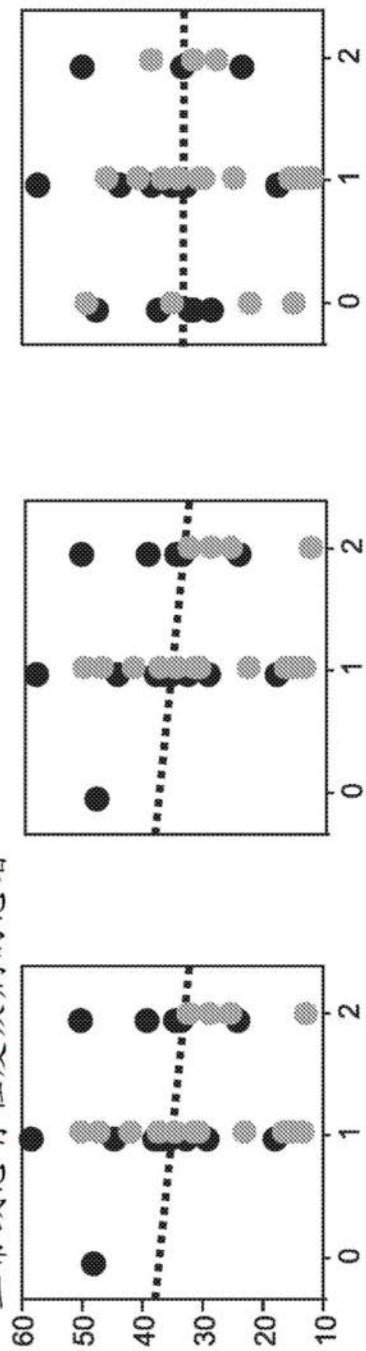


图 13B

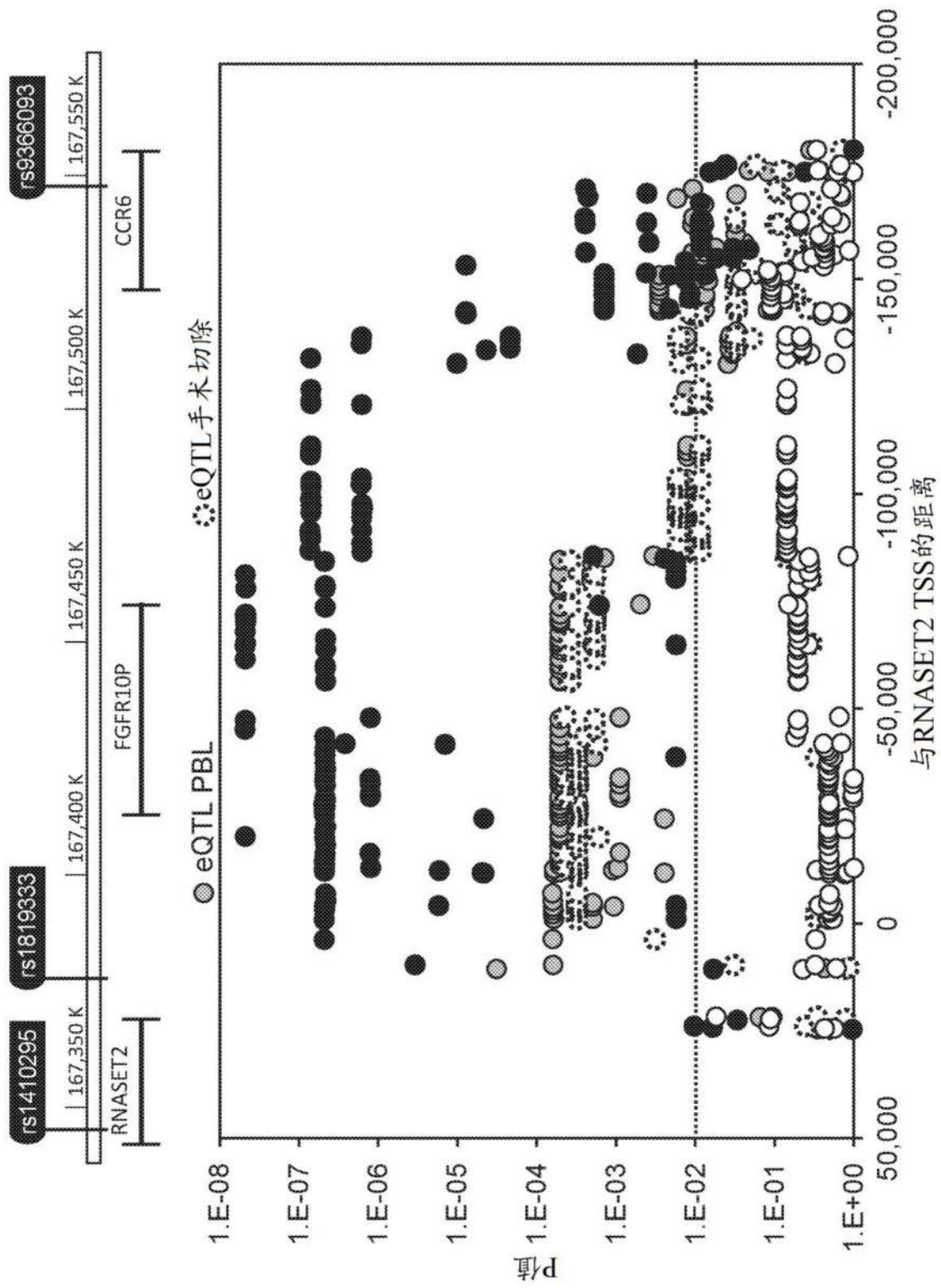


图14A

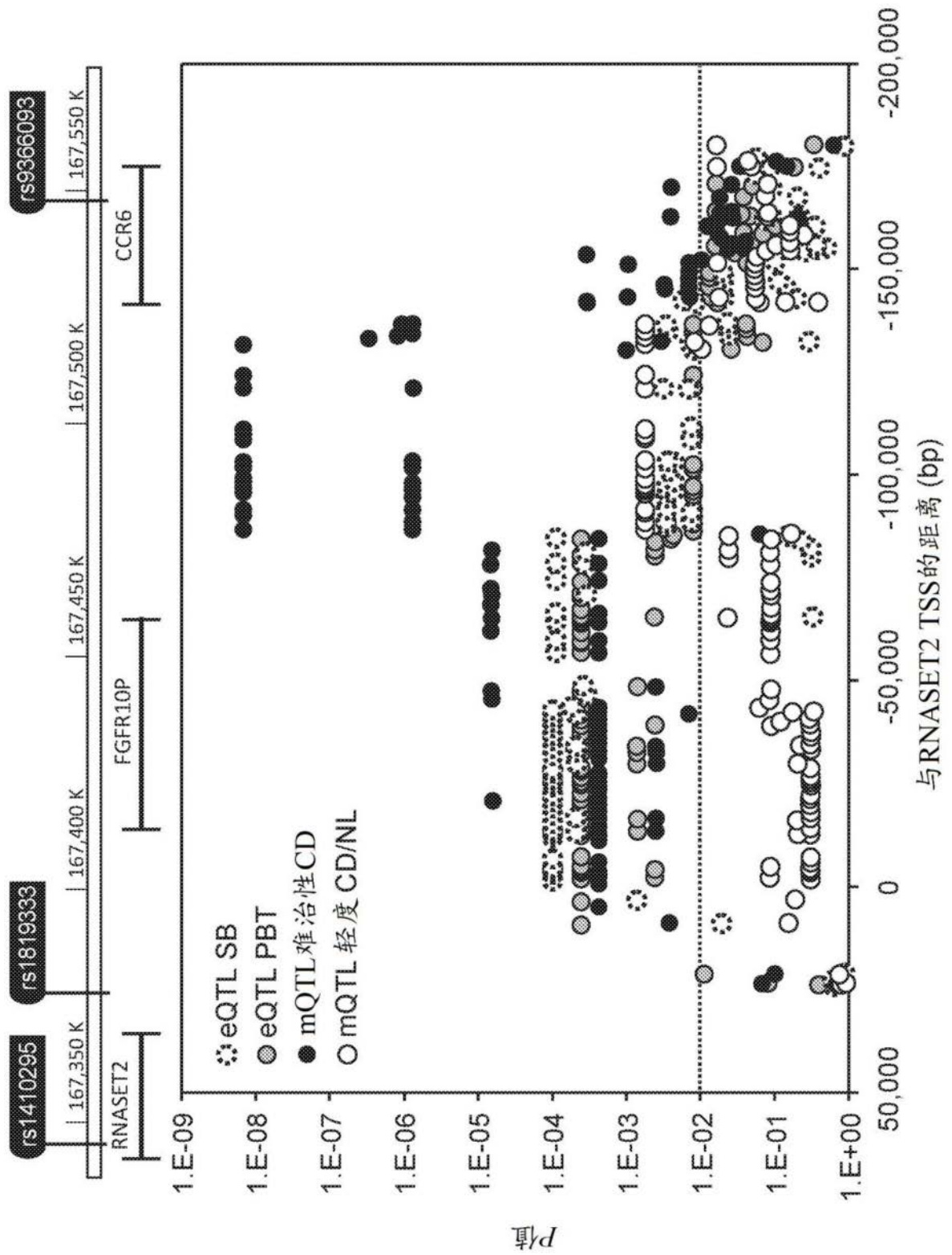


图14B

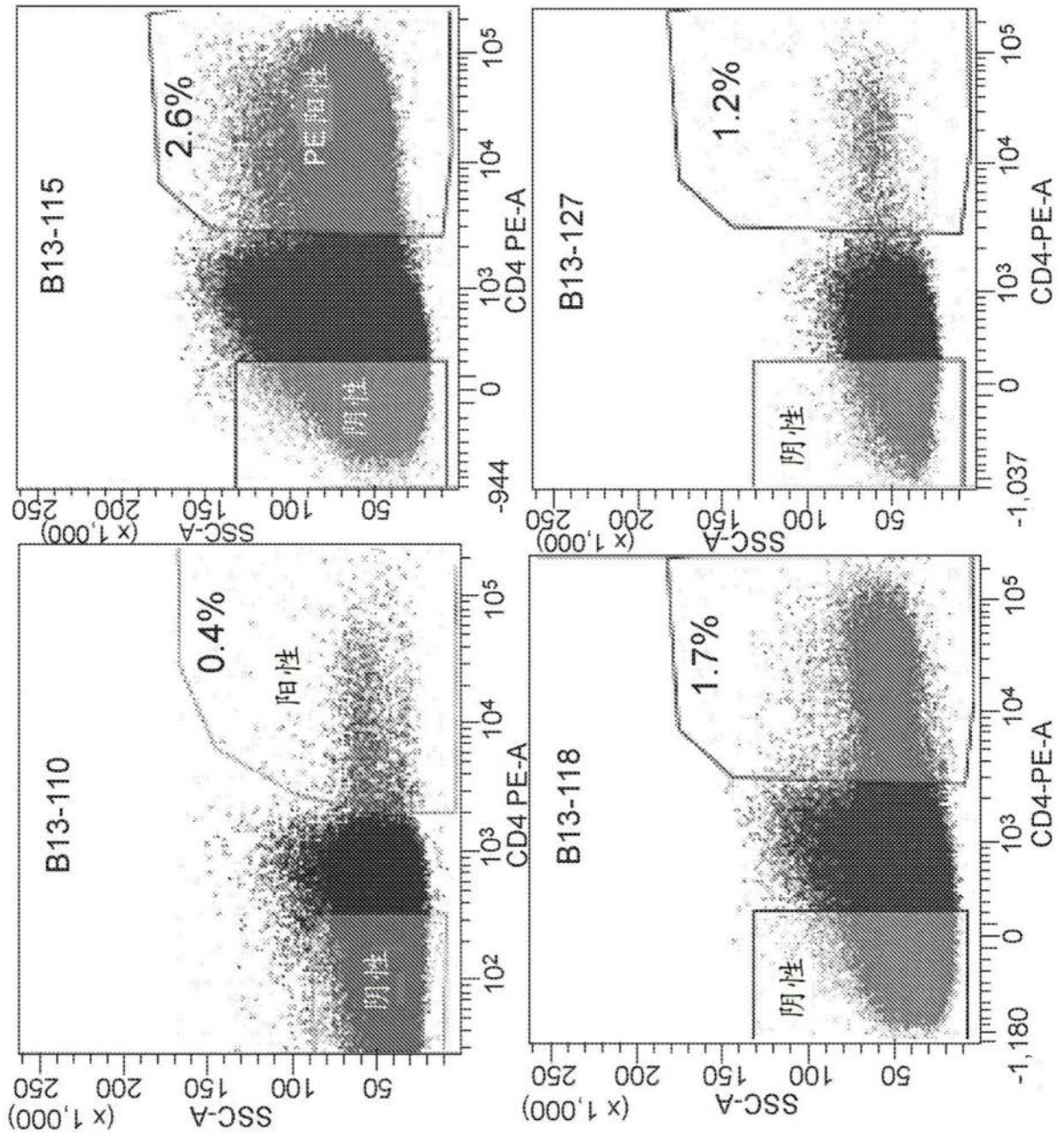


图15

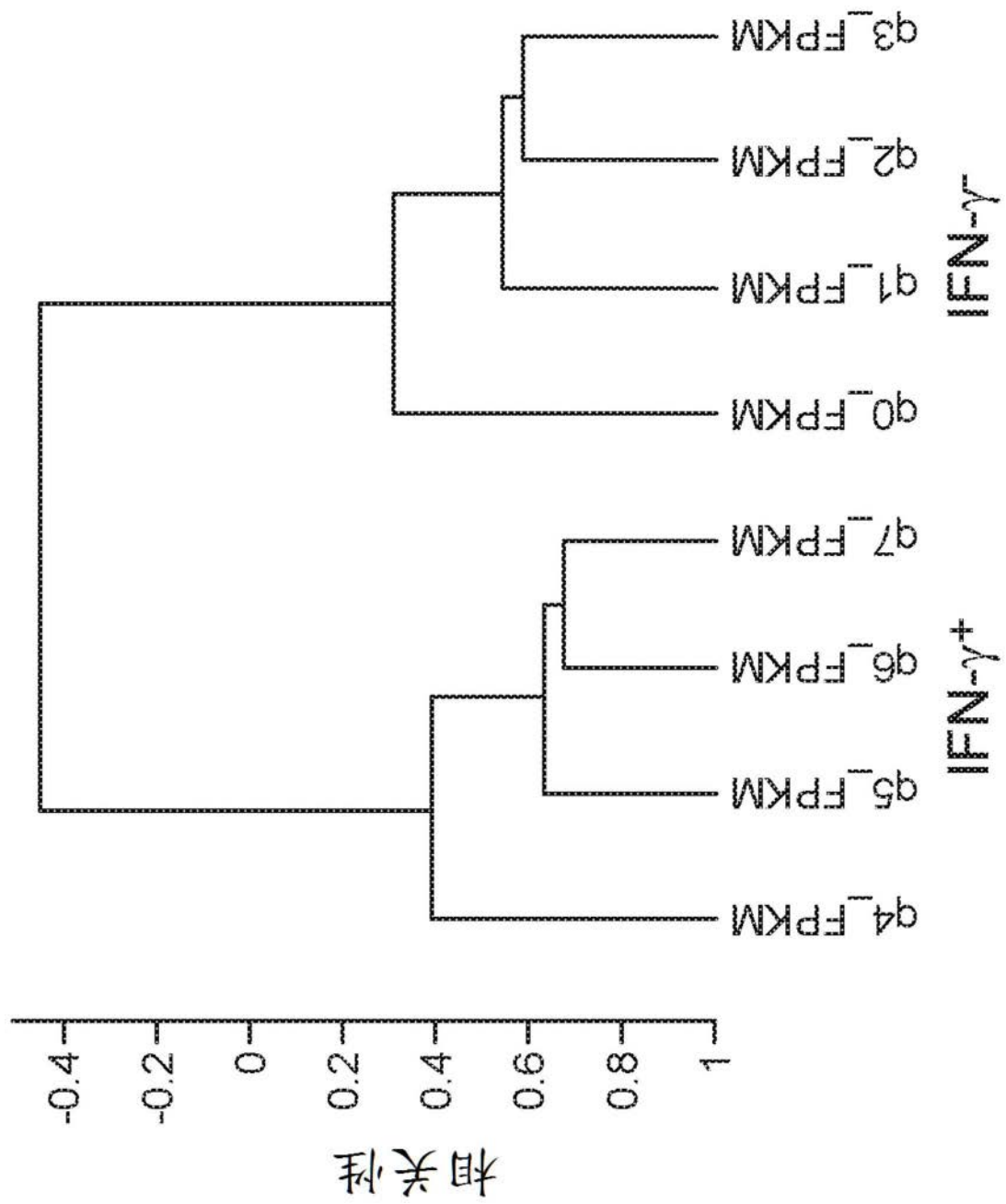


图16

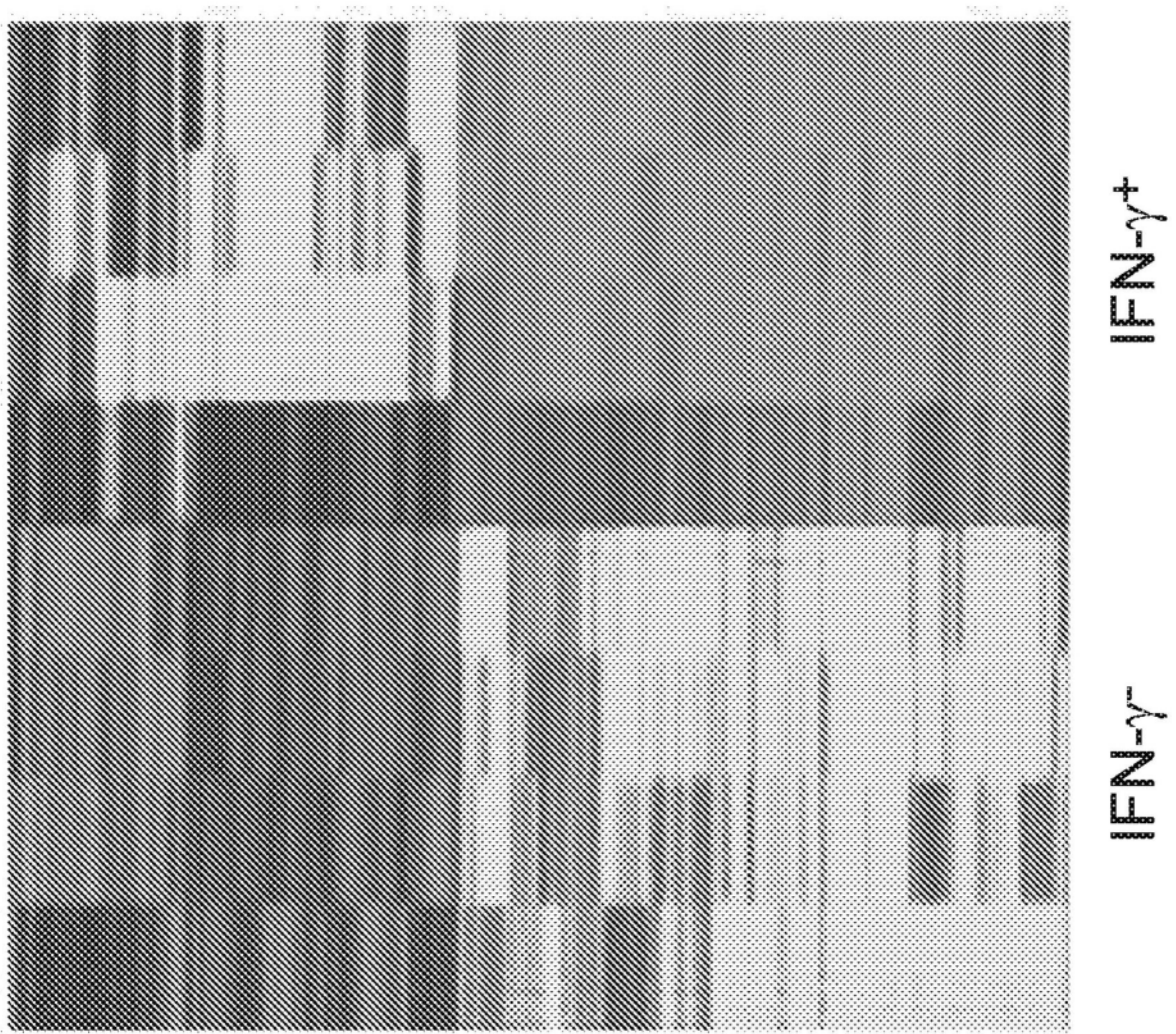


图17

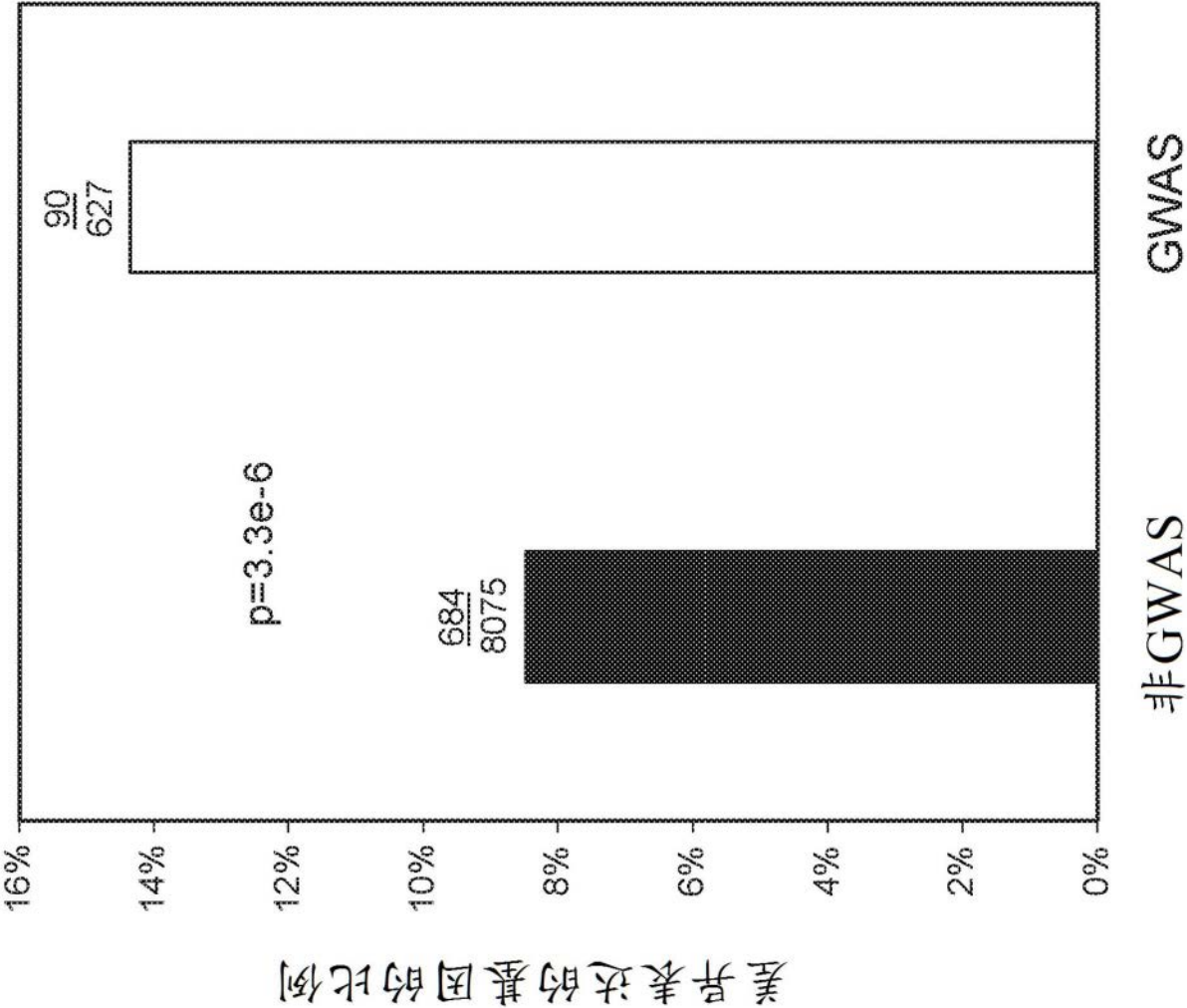


图18

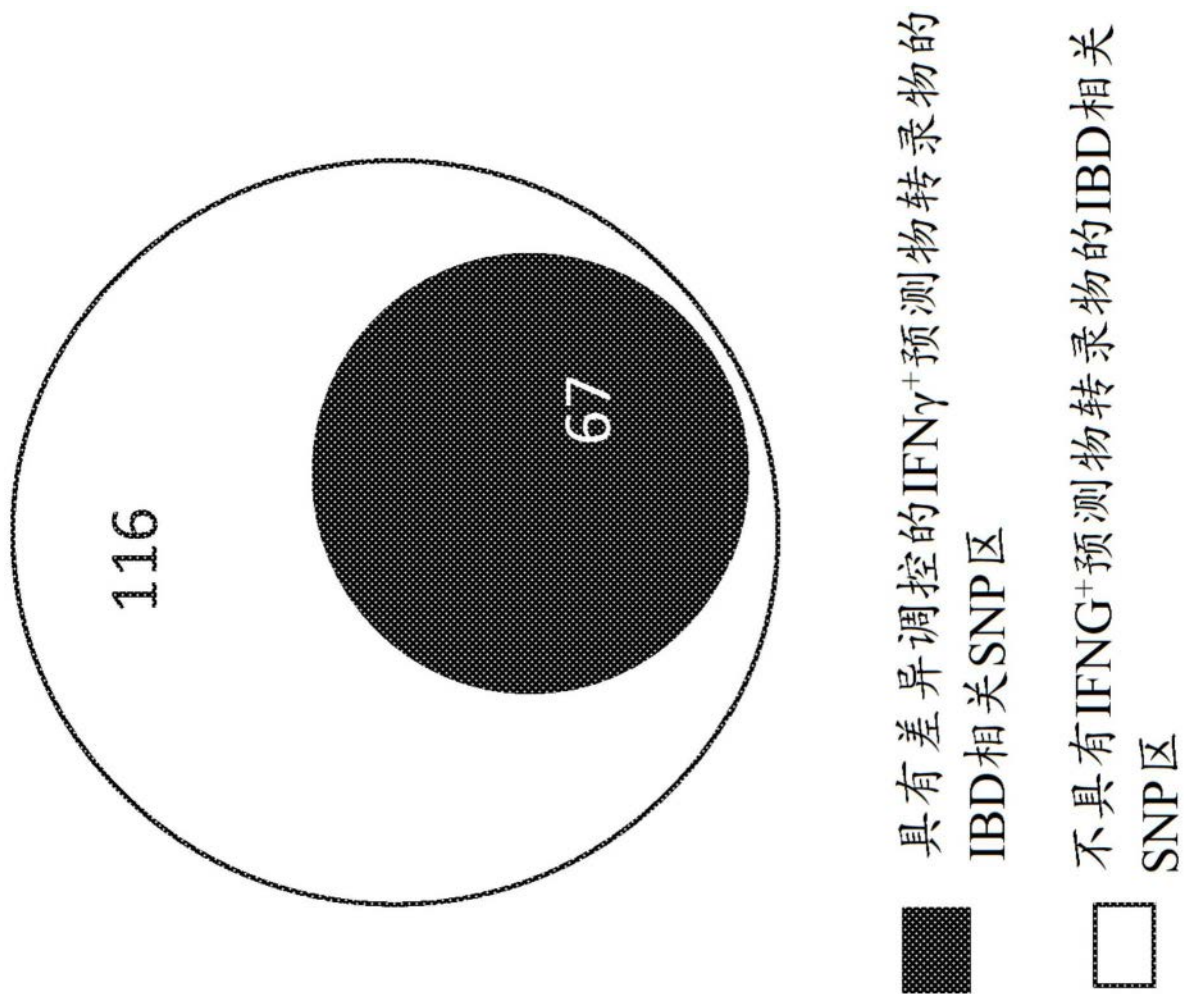


图19

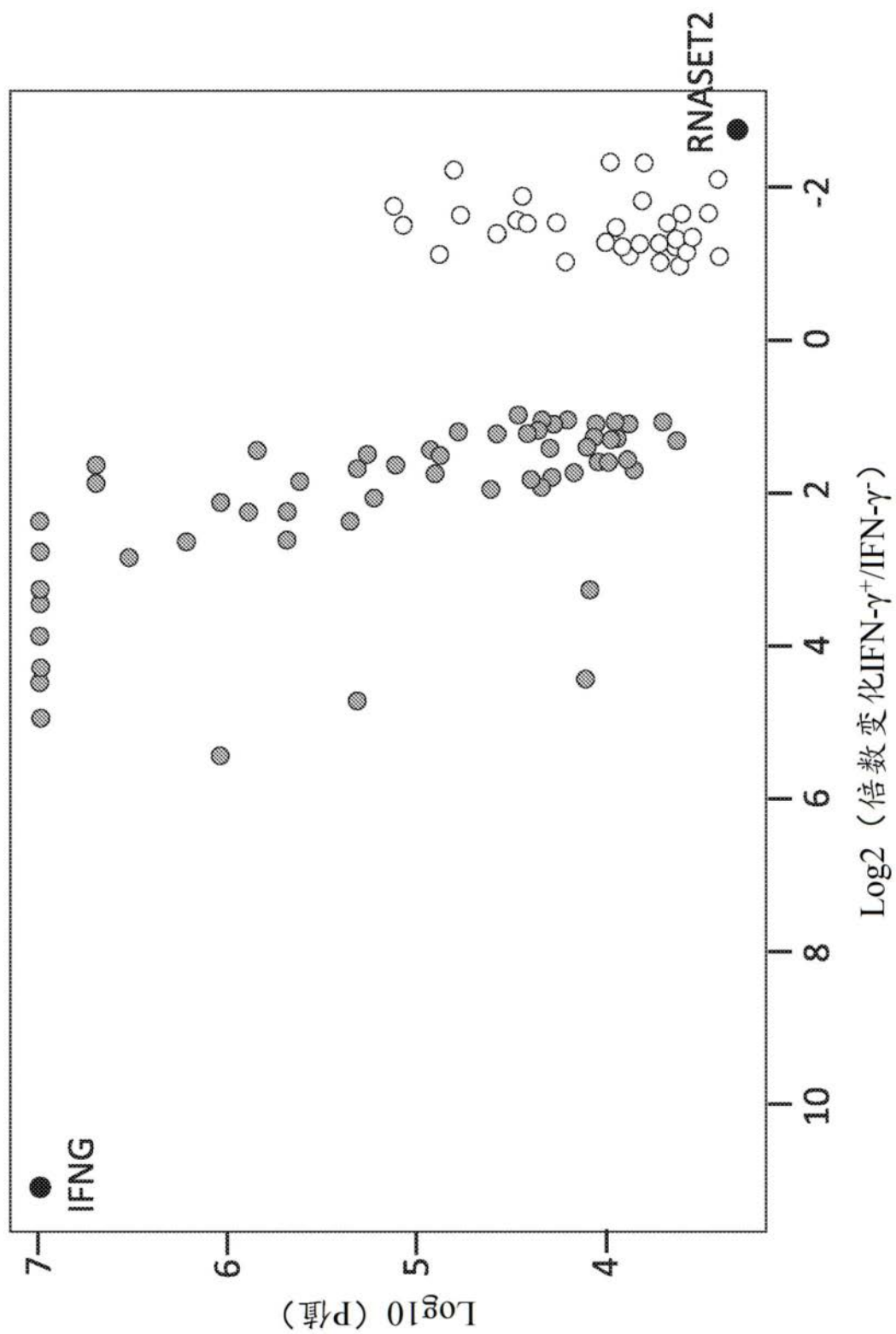


图20

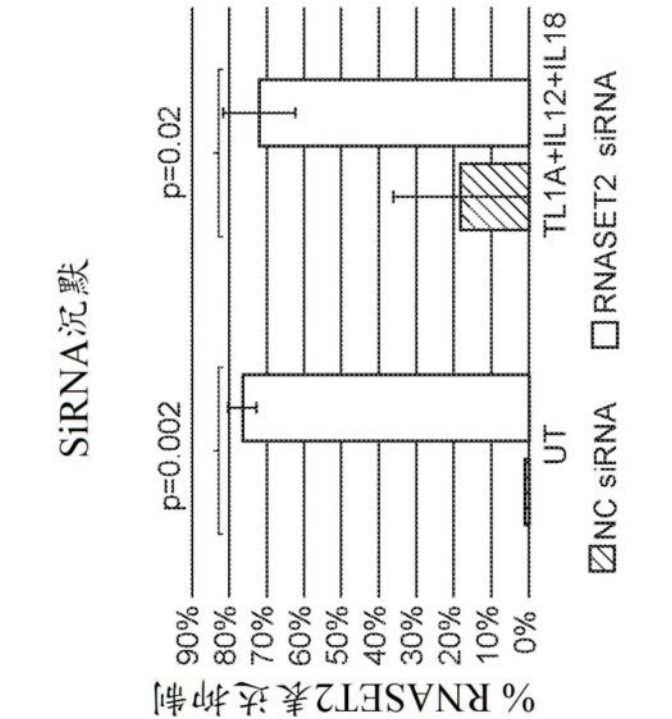


图21A

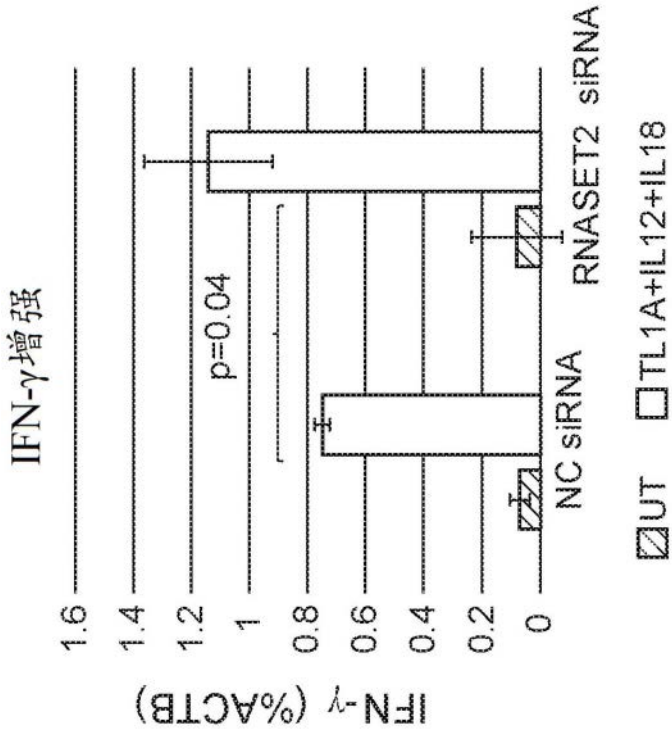


图21B

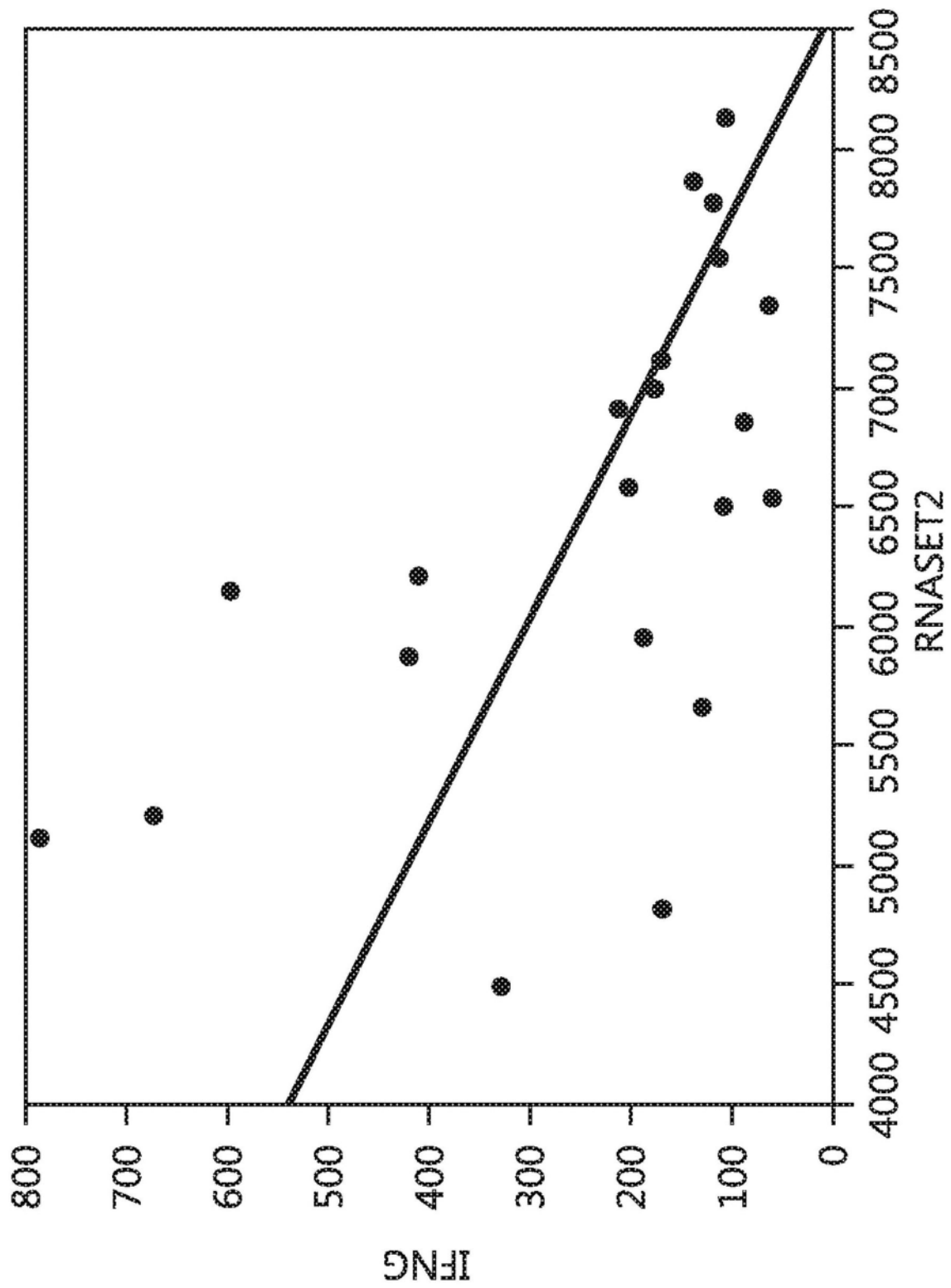


图22

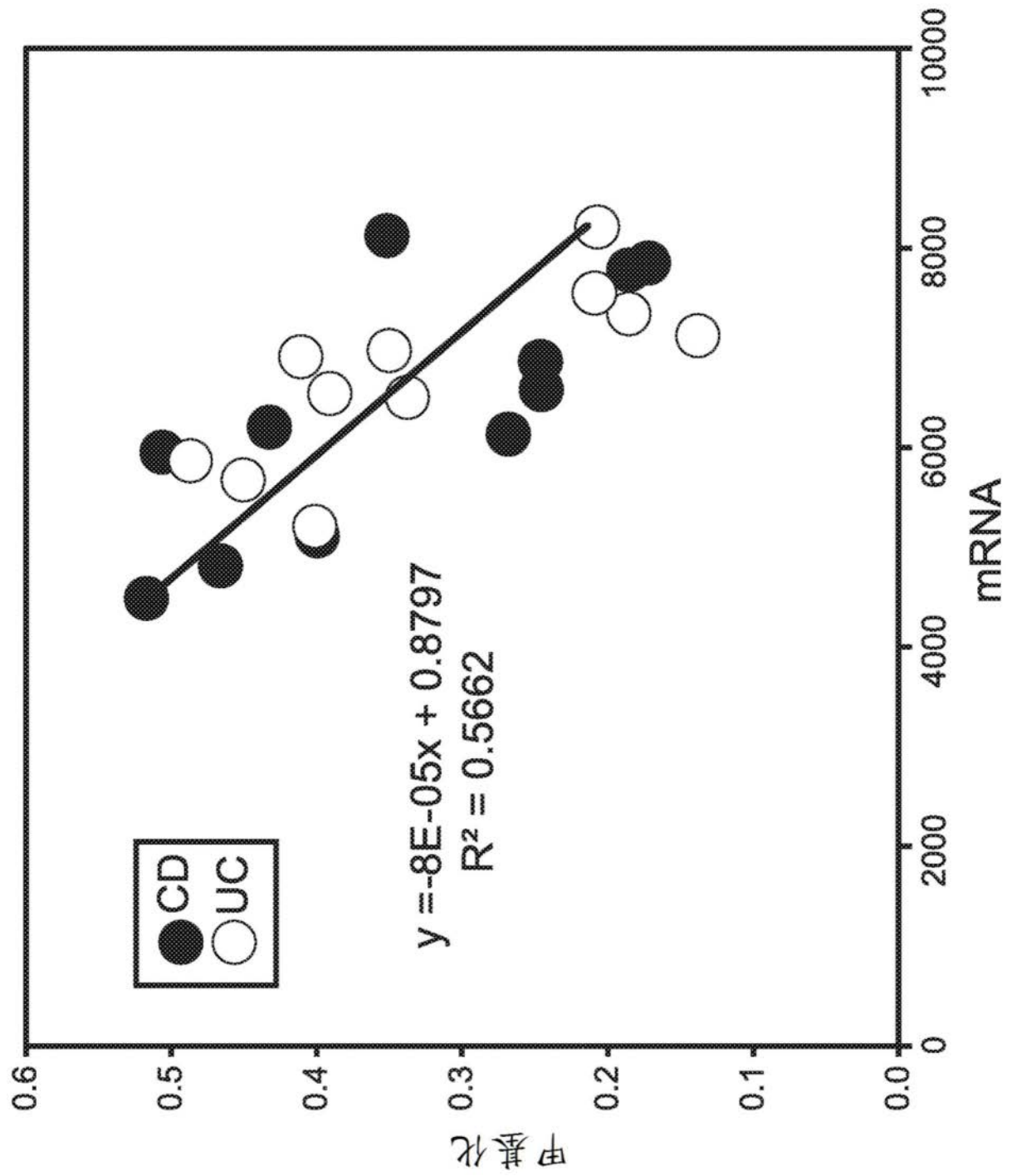


图23

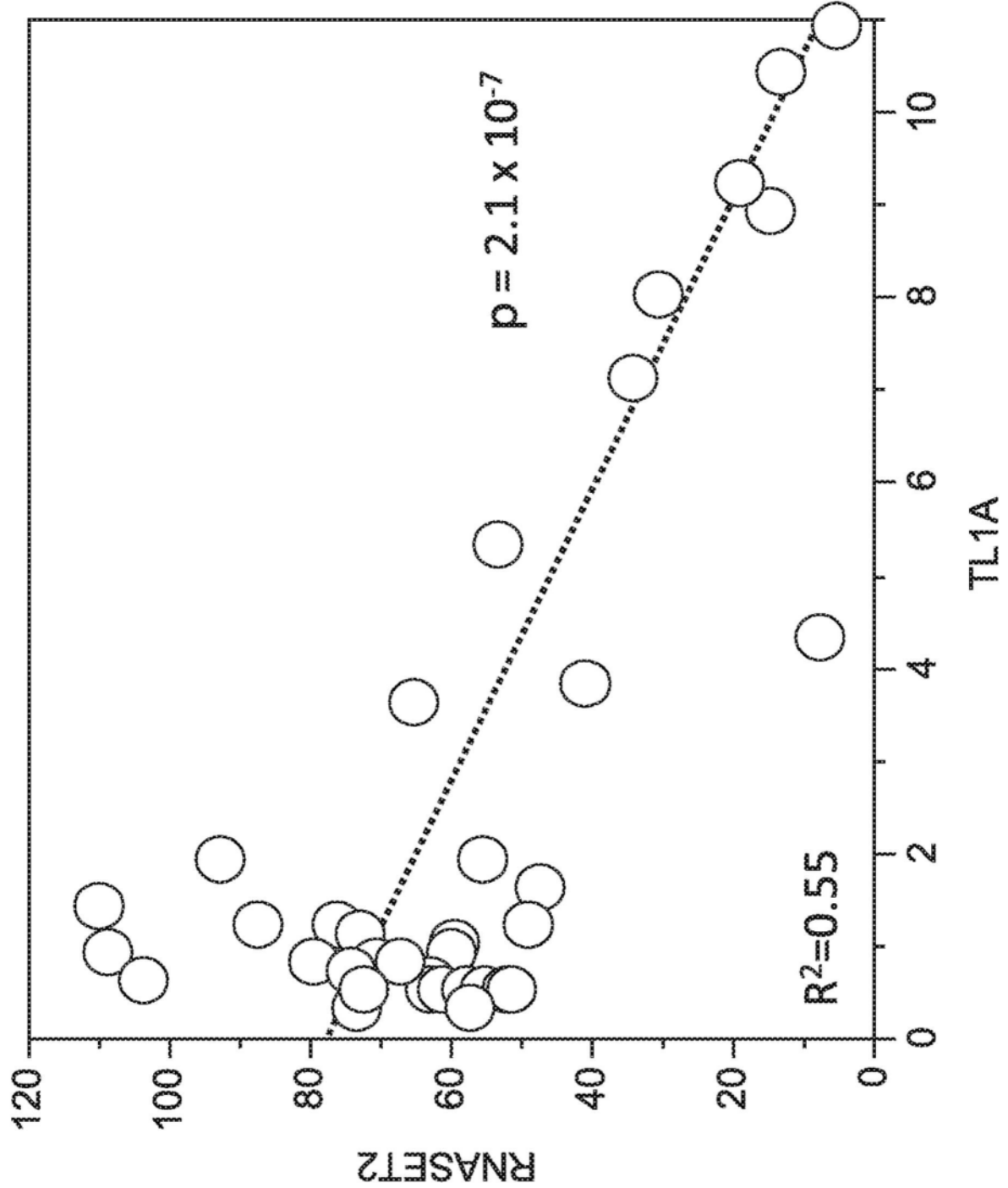


图24A

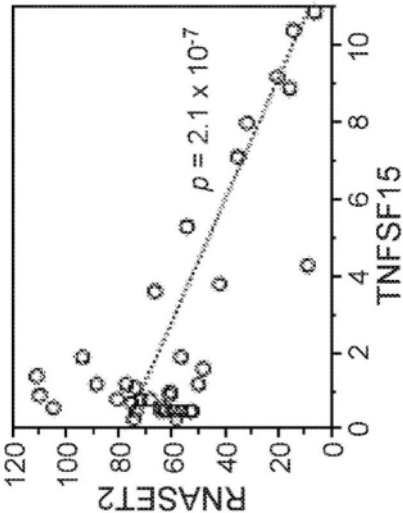


图24B

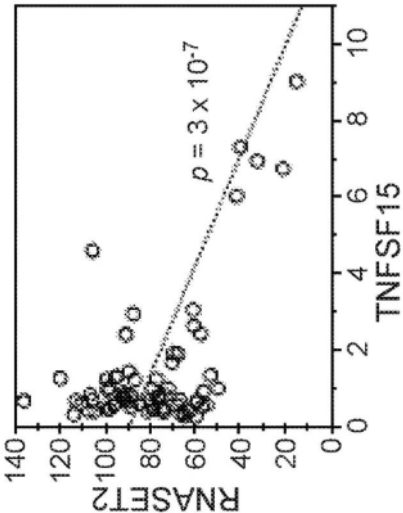


图24C

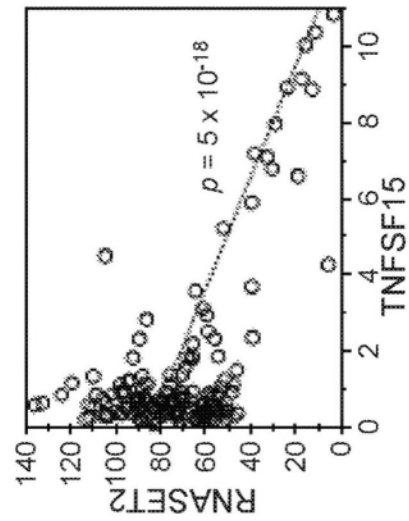


图24D

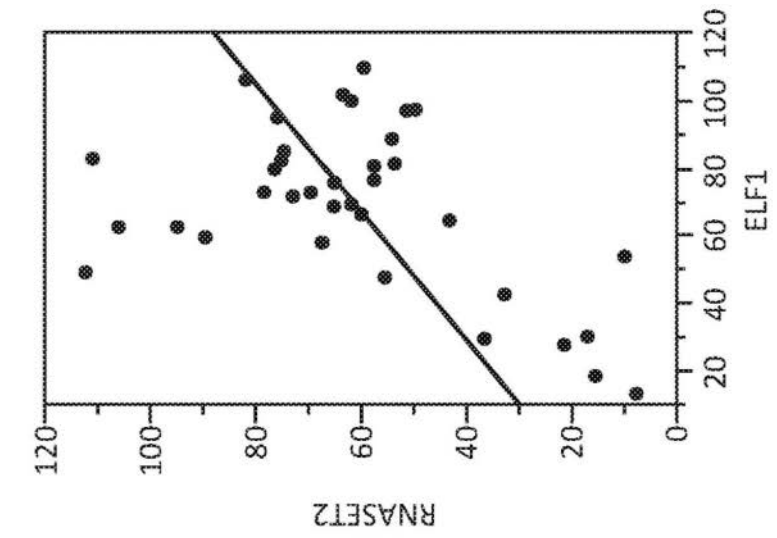
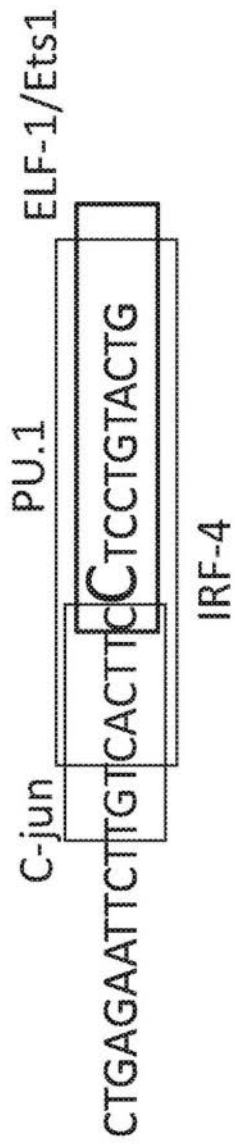


图 25B

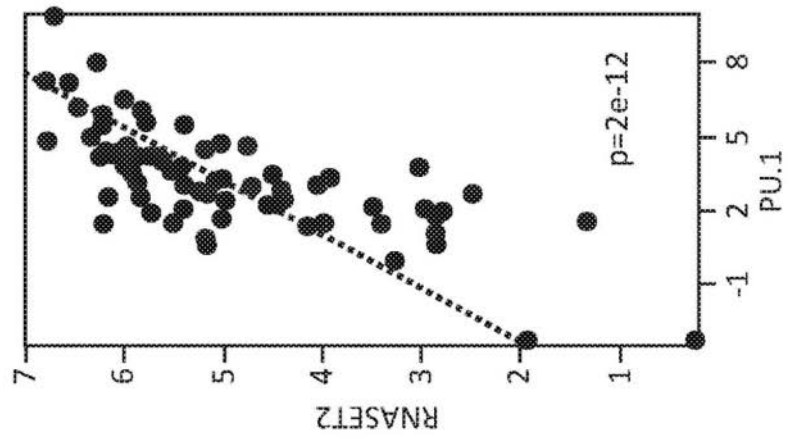


图 25A

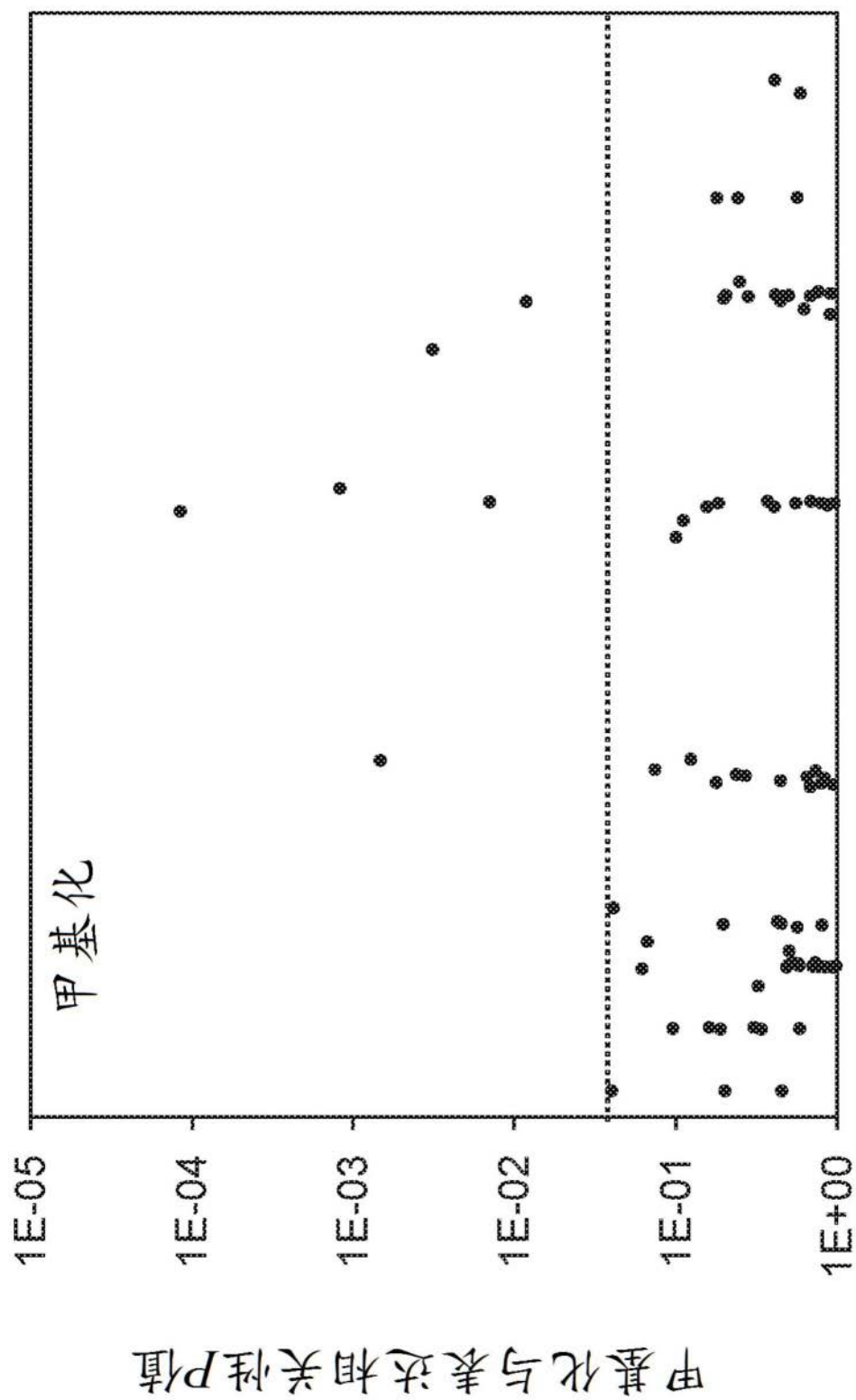


图26

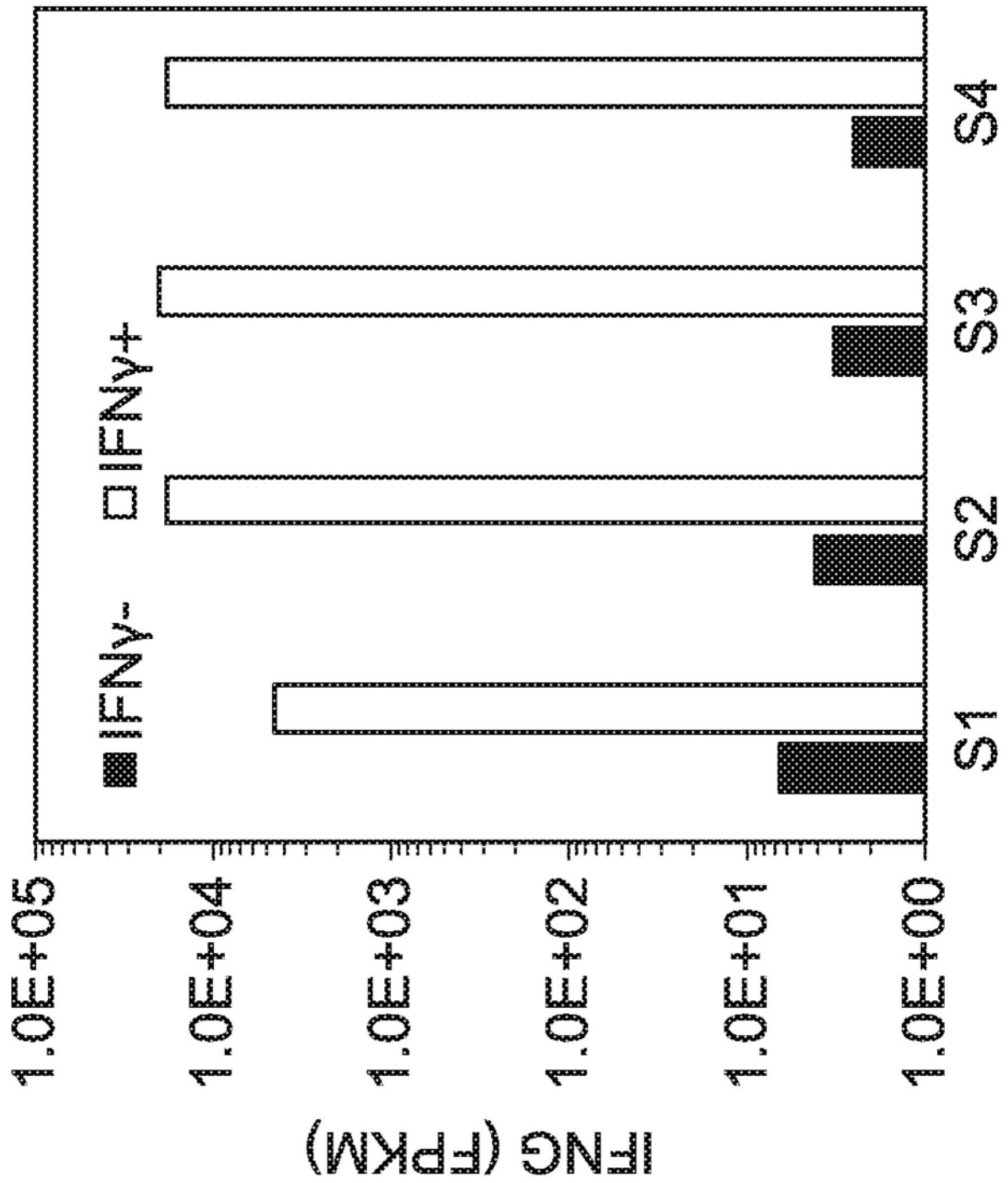


图27

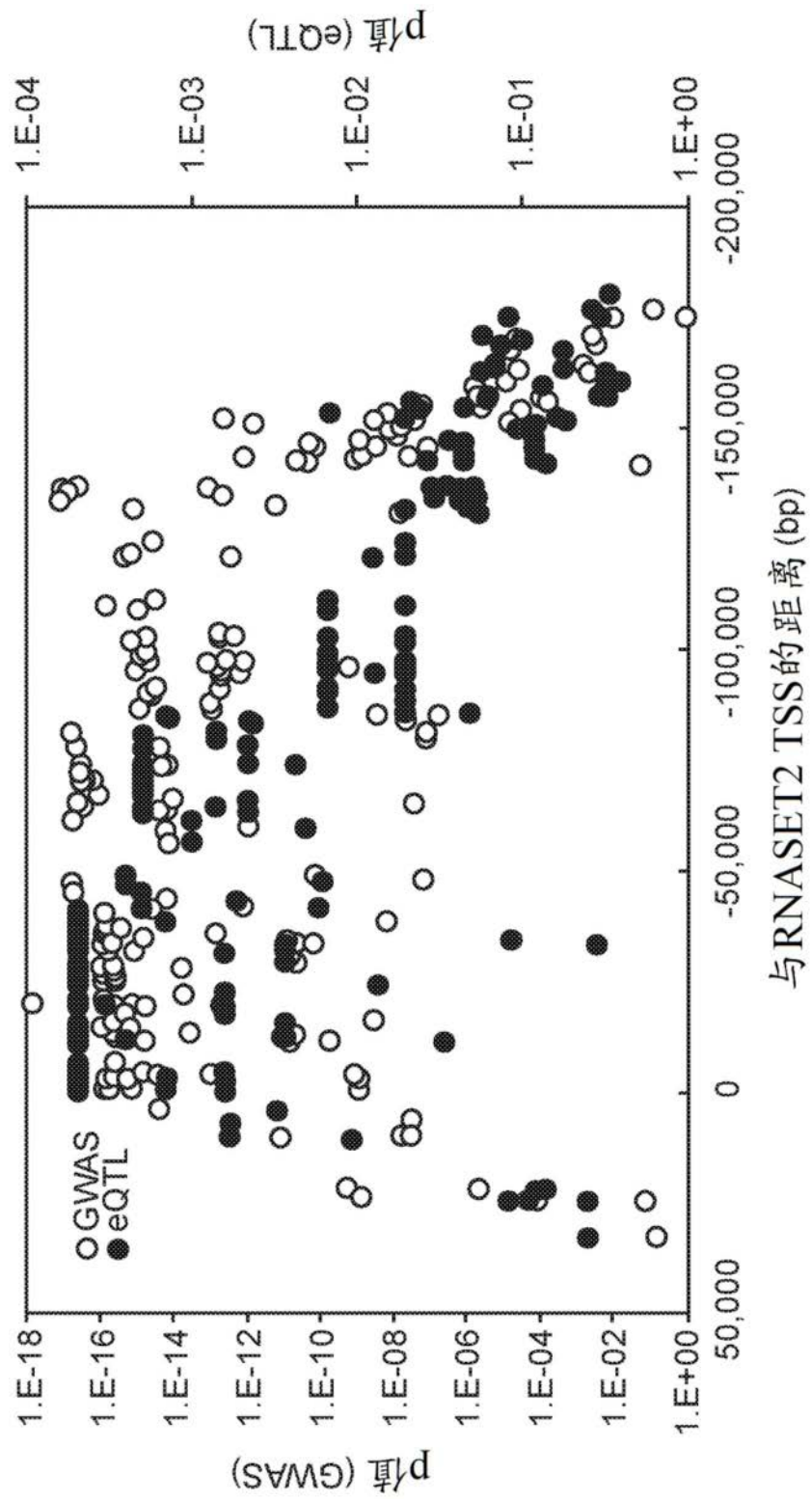


图28

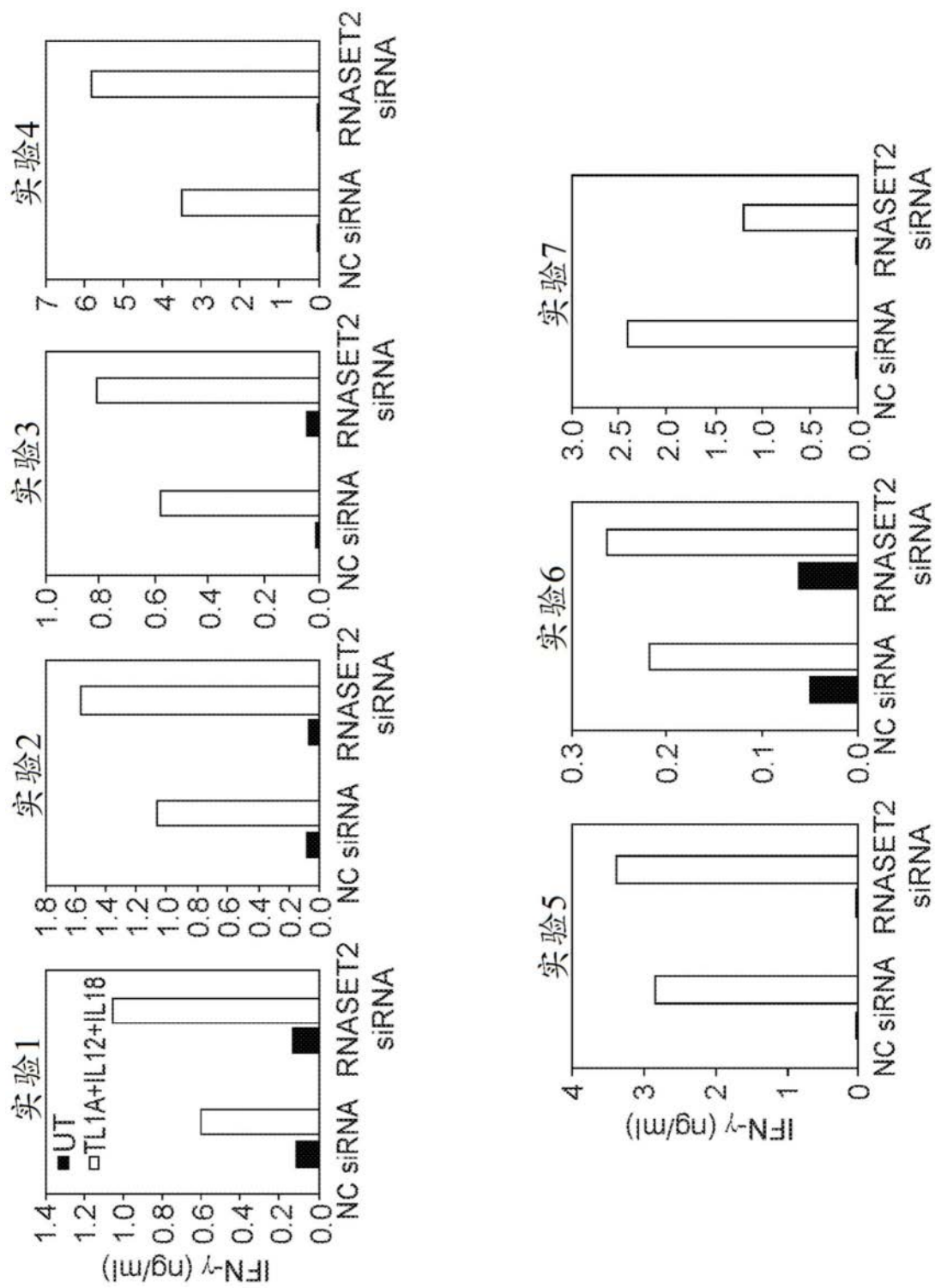


图29

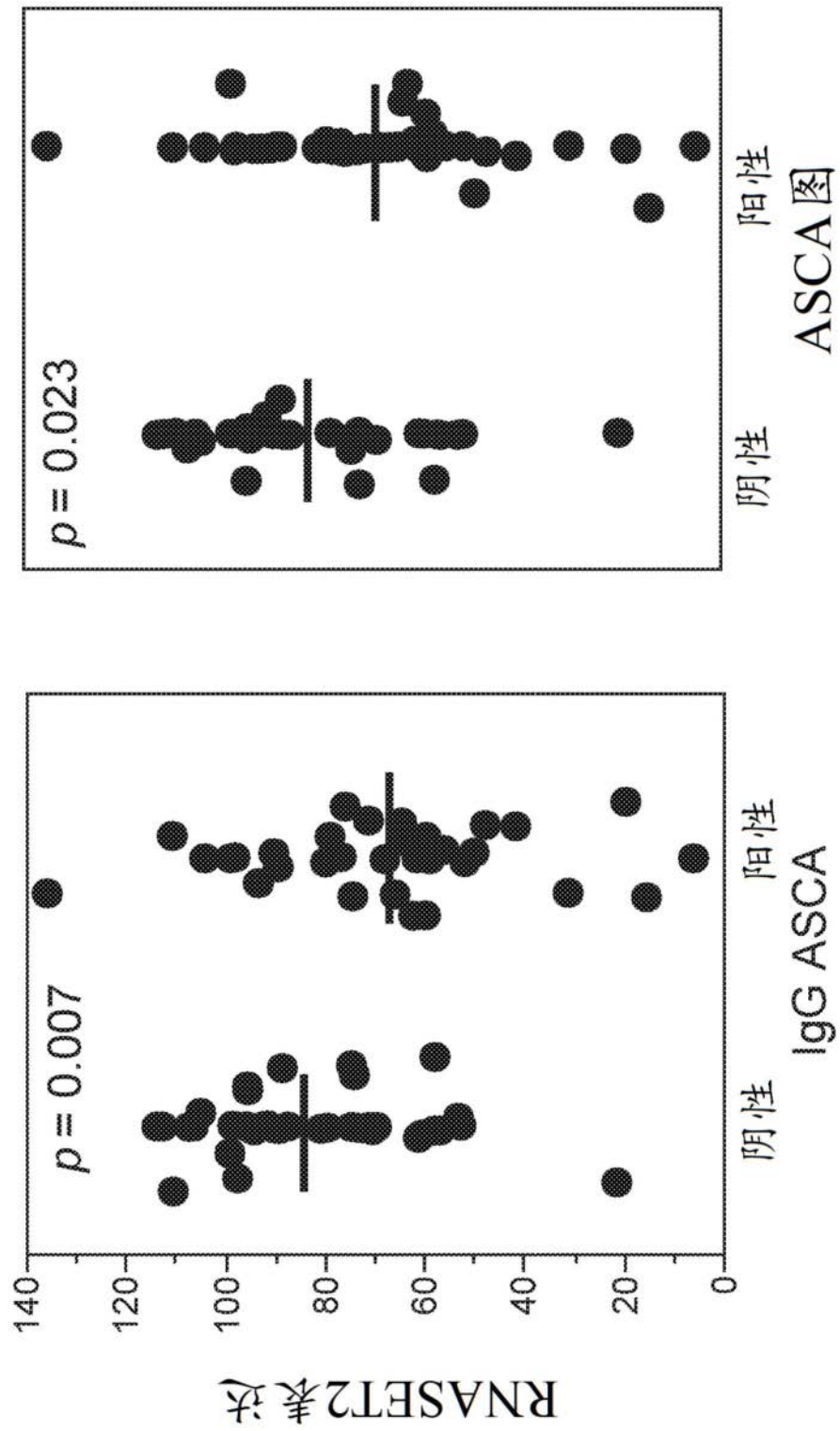


图30

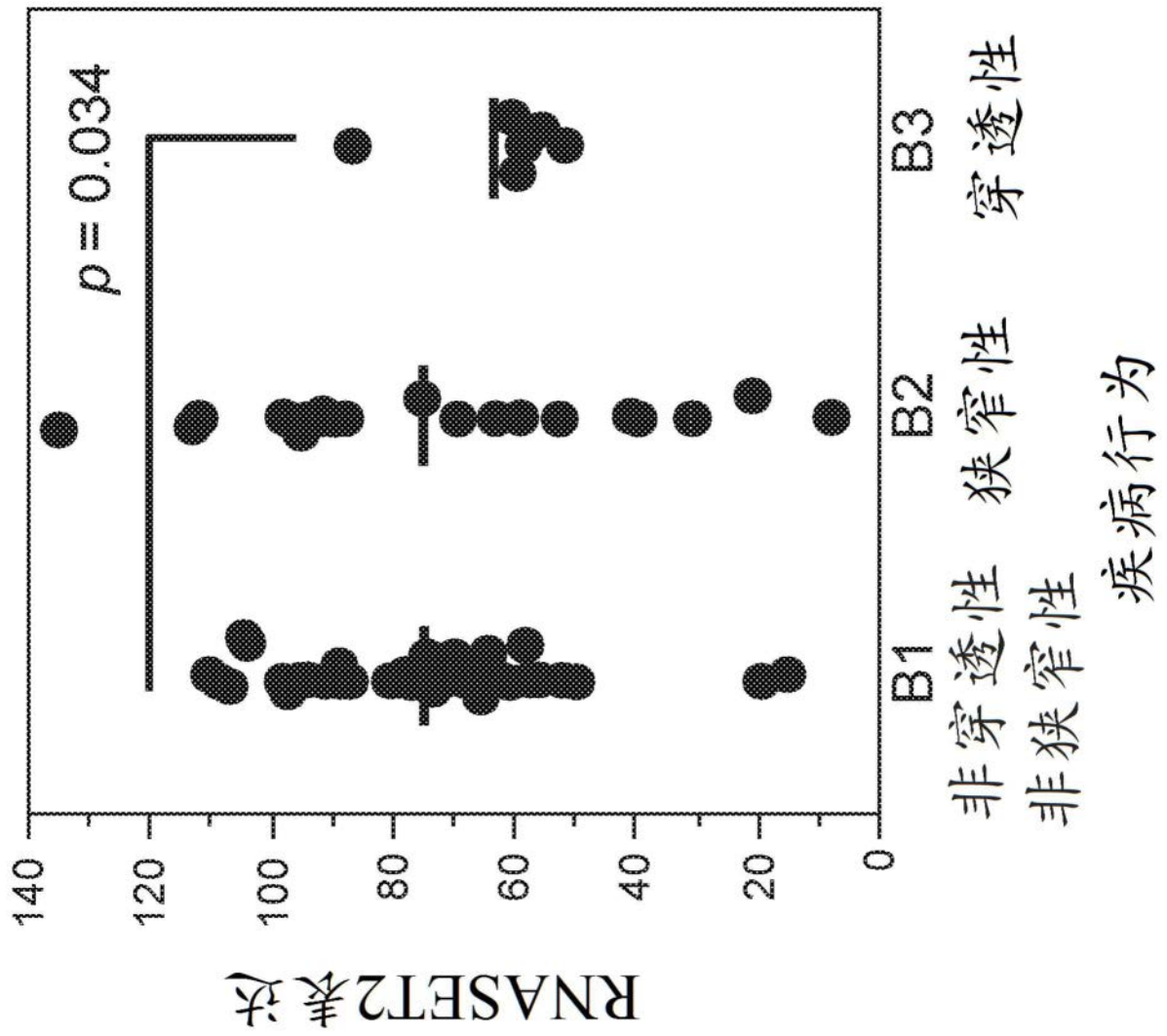


图31

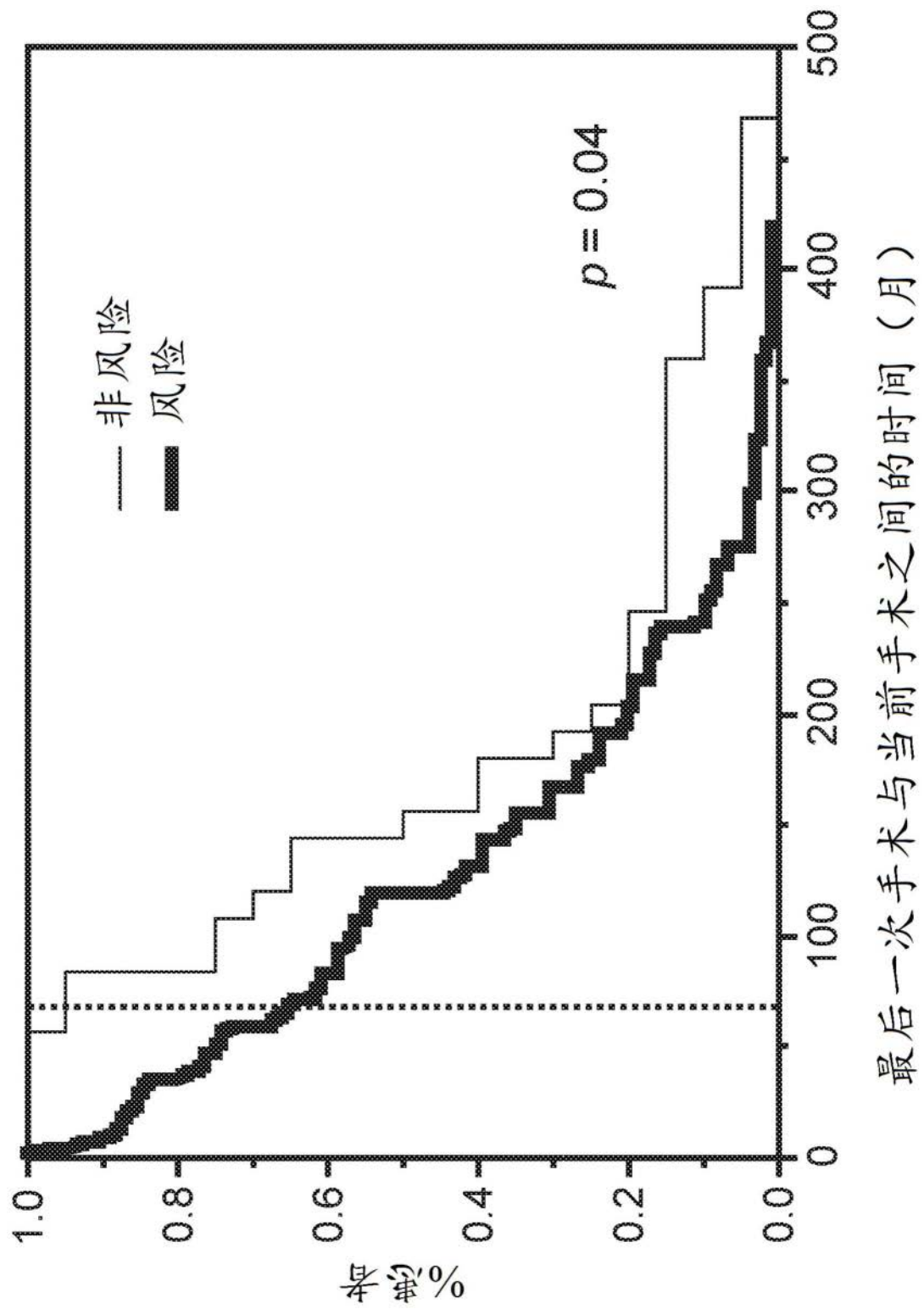


图32

DNA形状

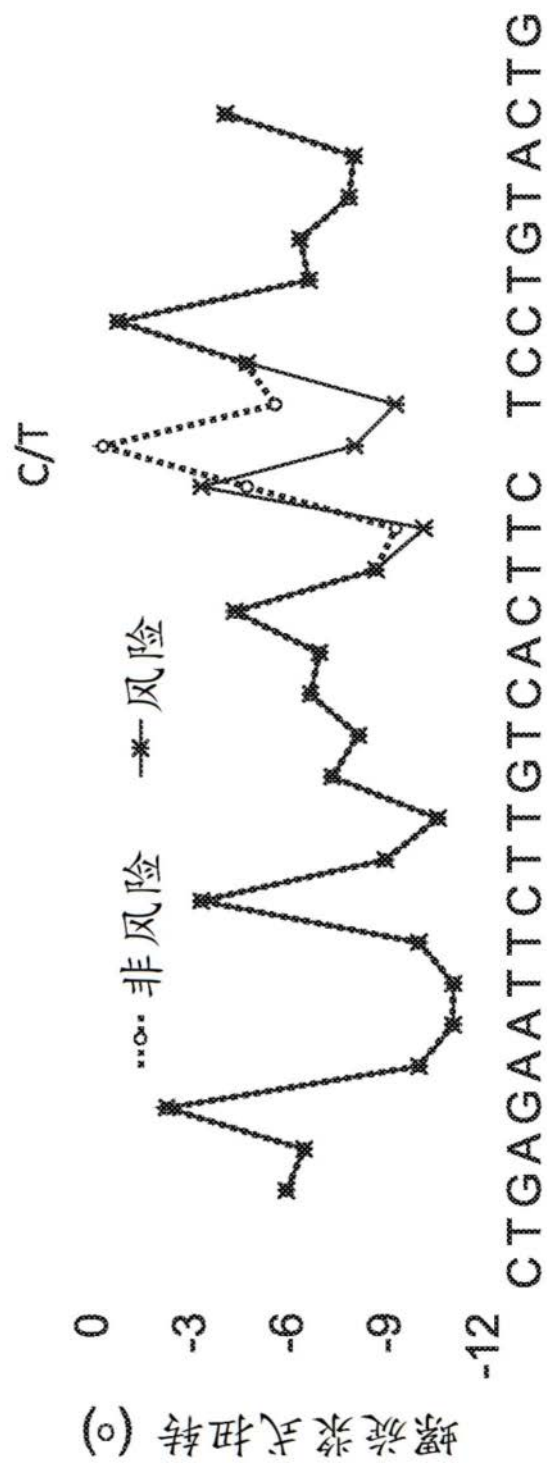


图33

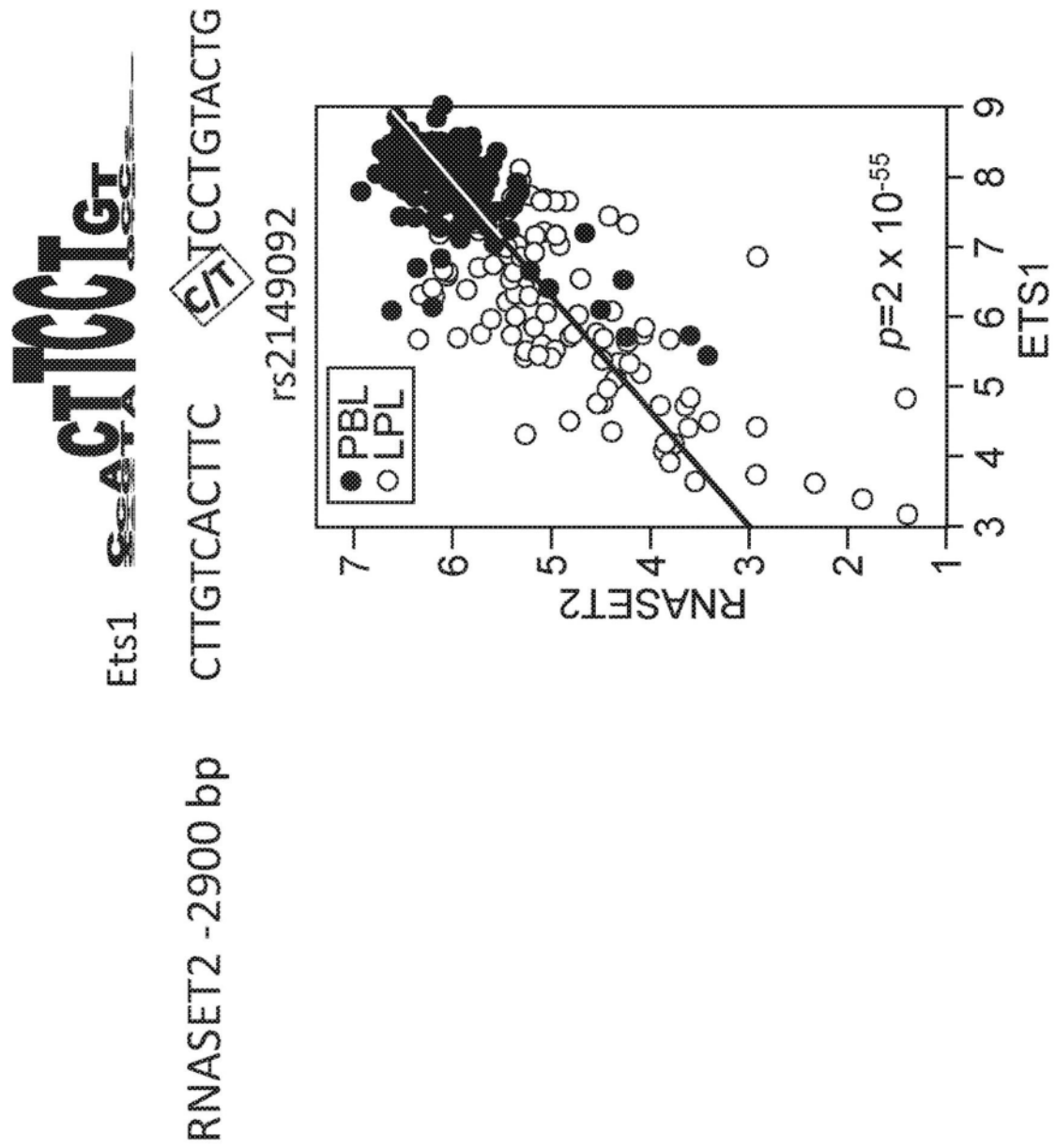


图34

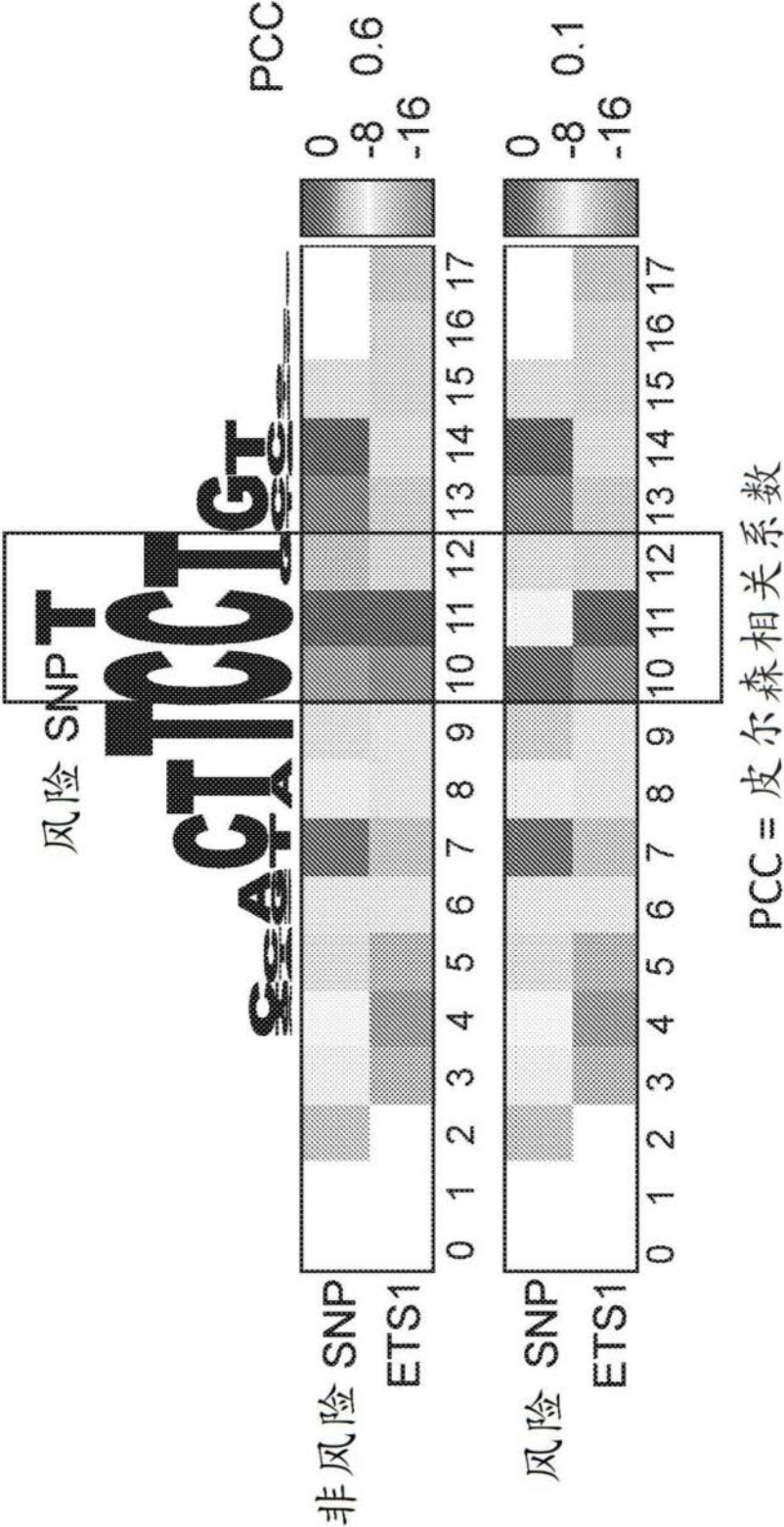


图35

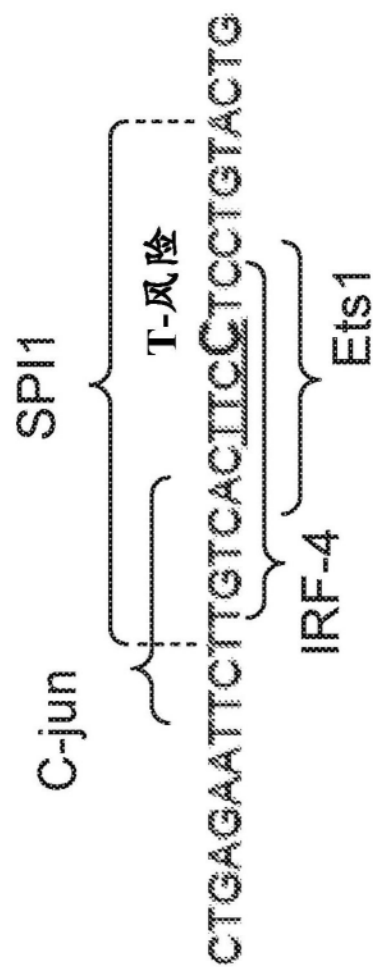


图36A

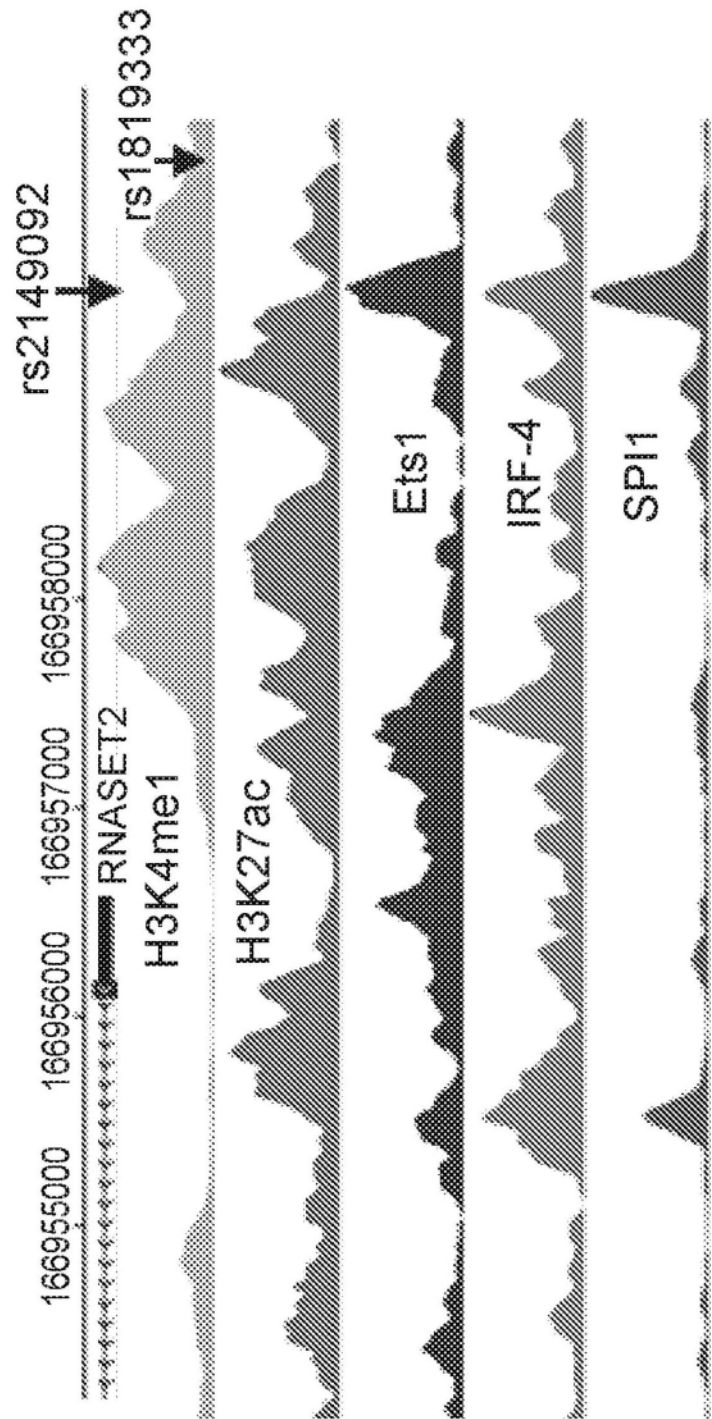


图36B

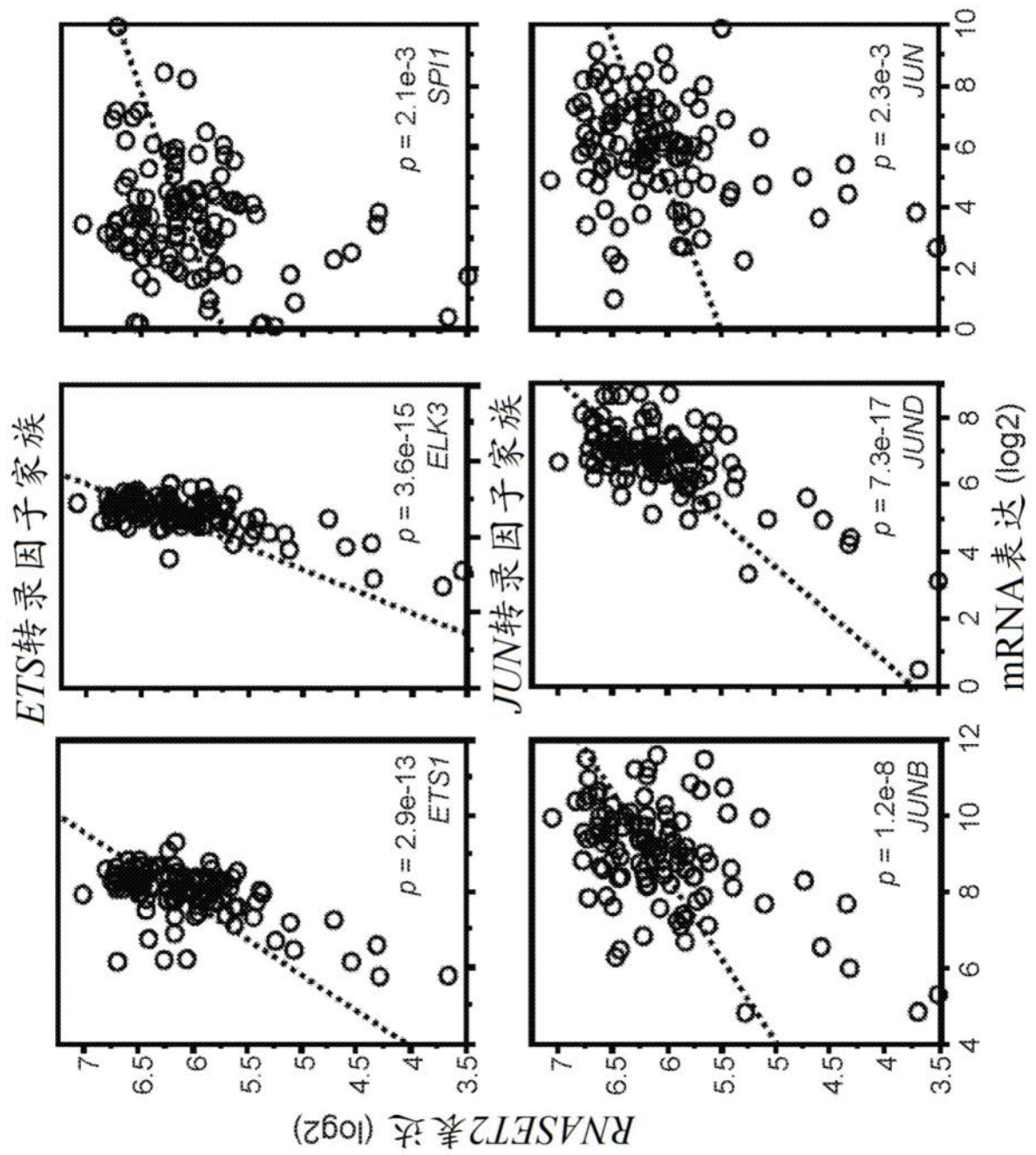


图36C

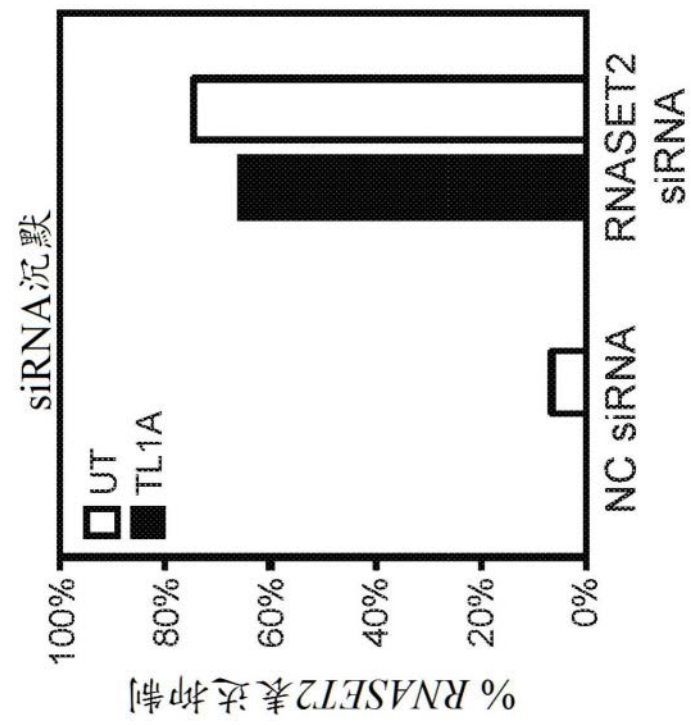


图37A

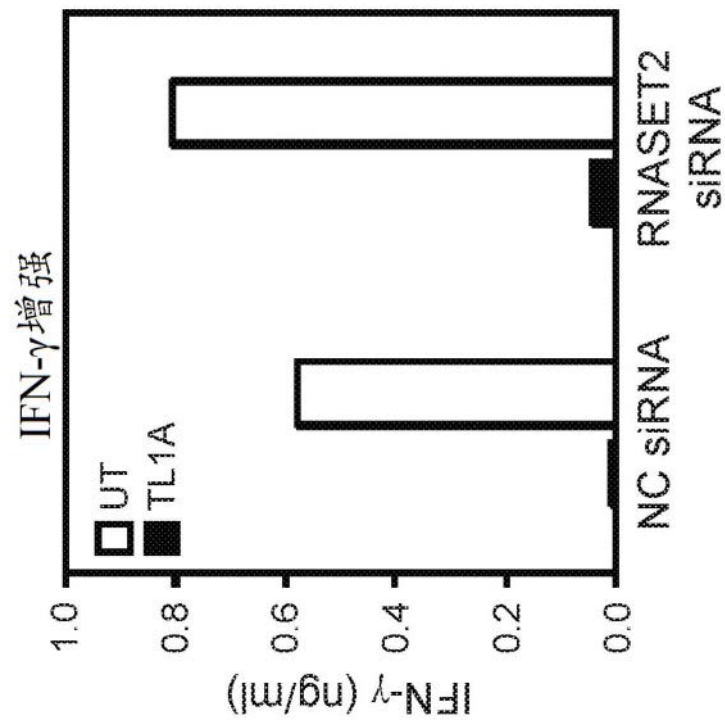


图37B

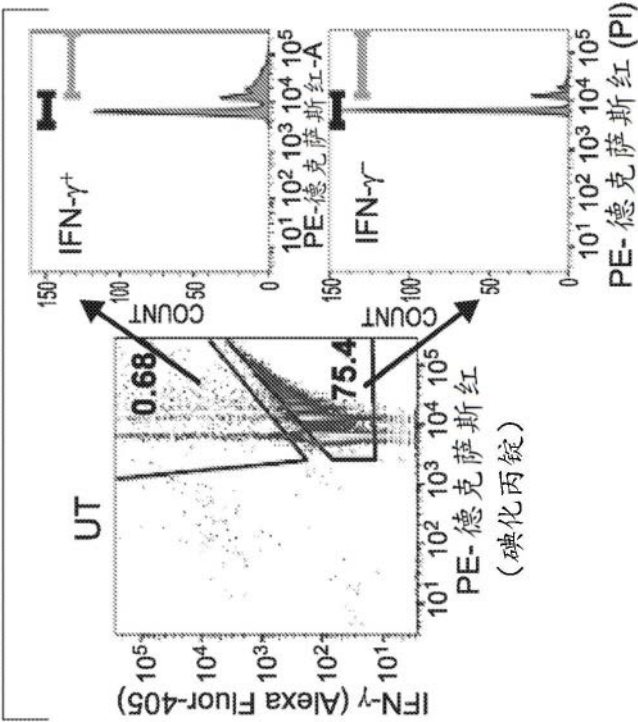


图37C

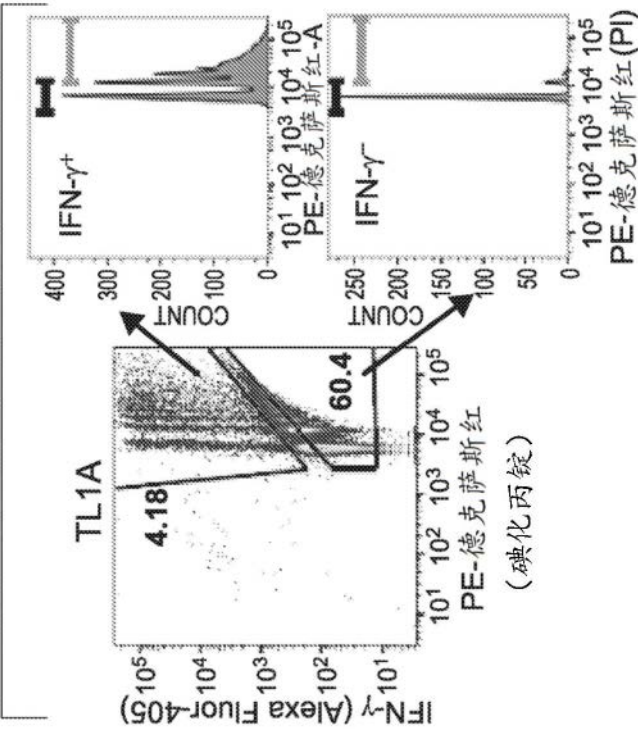


图37D

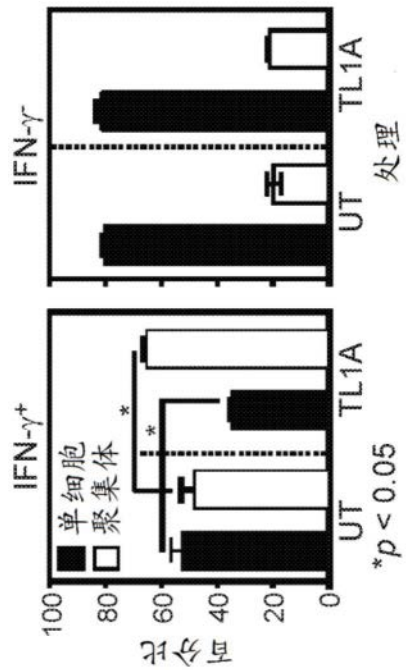


图37E

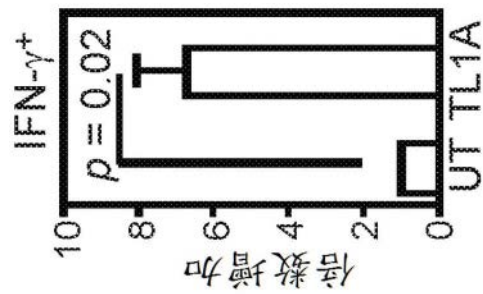


图37F

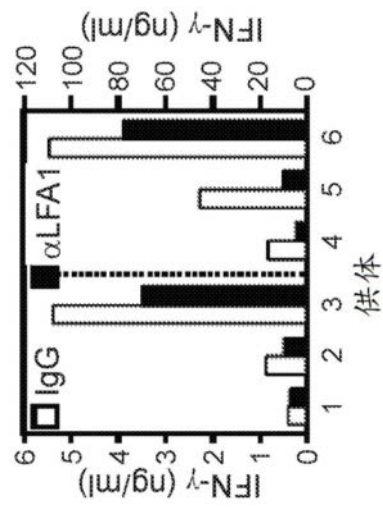


图37G

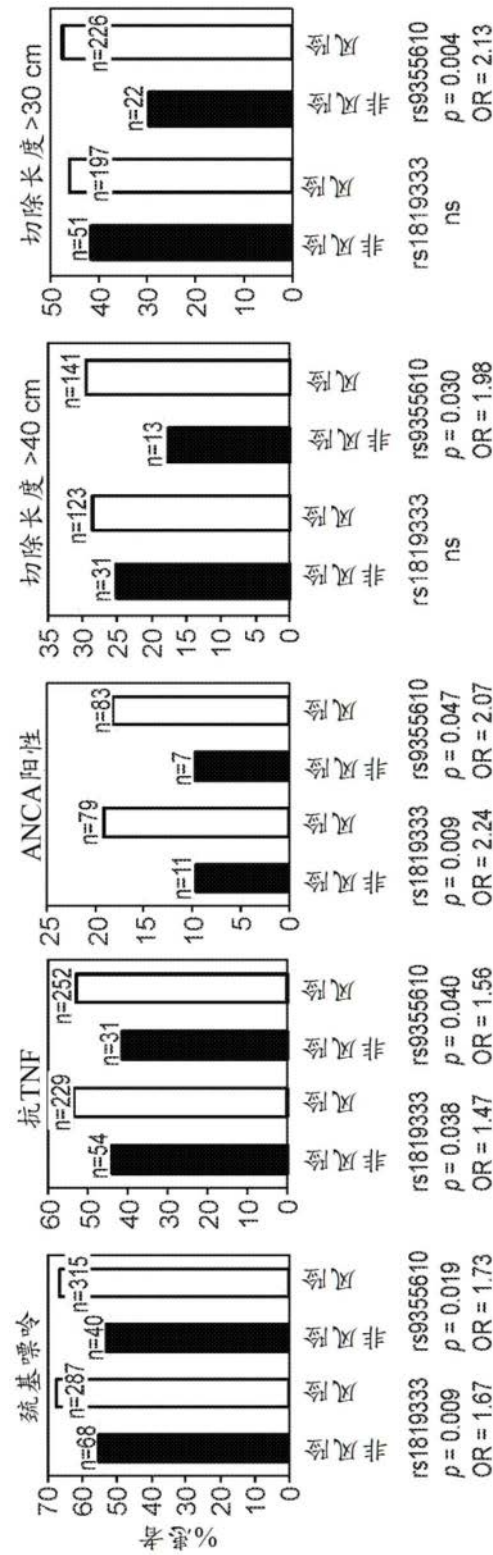


图38

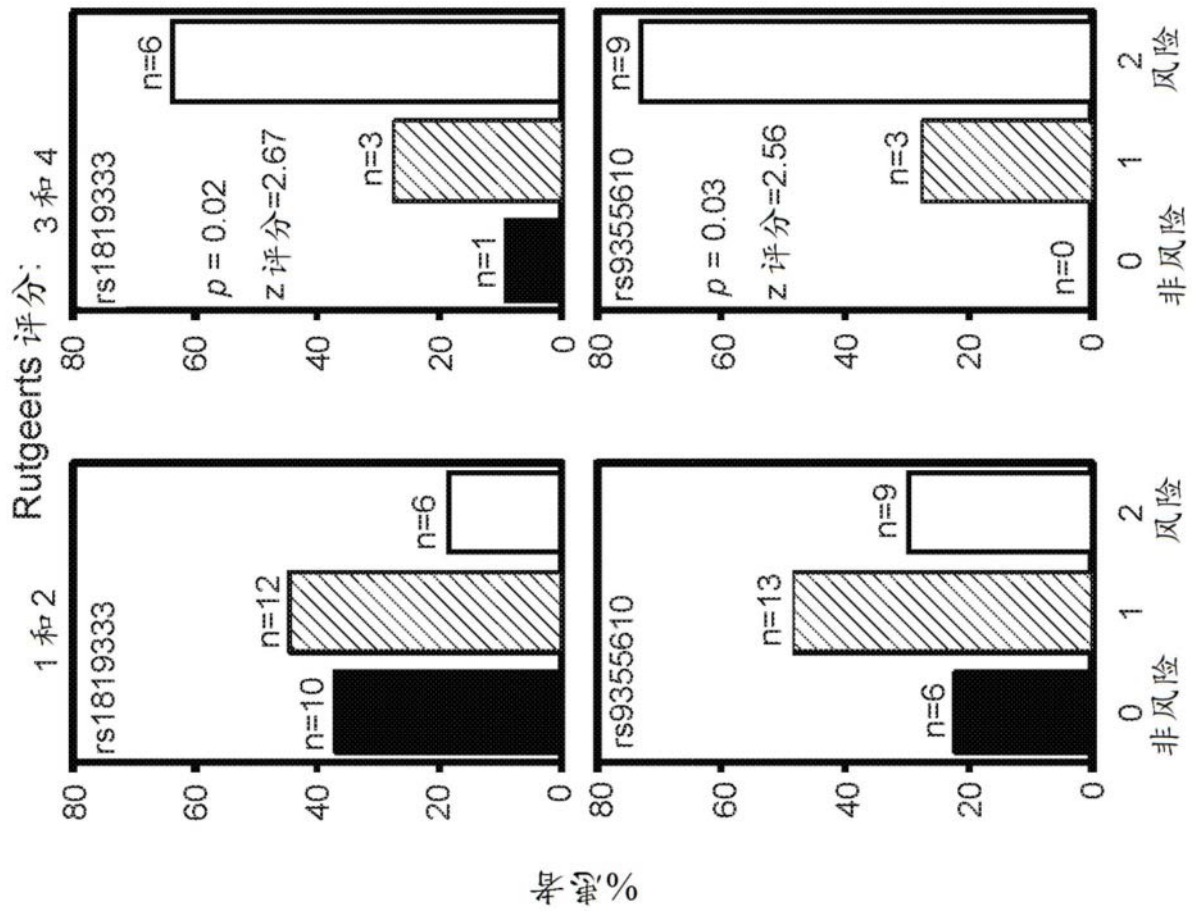


图39

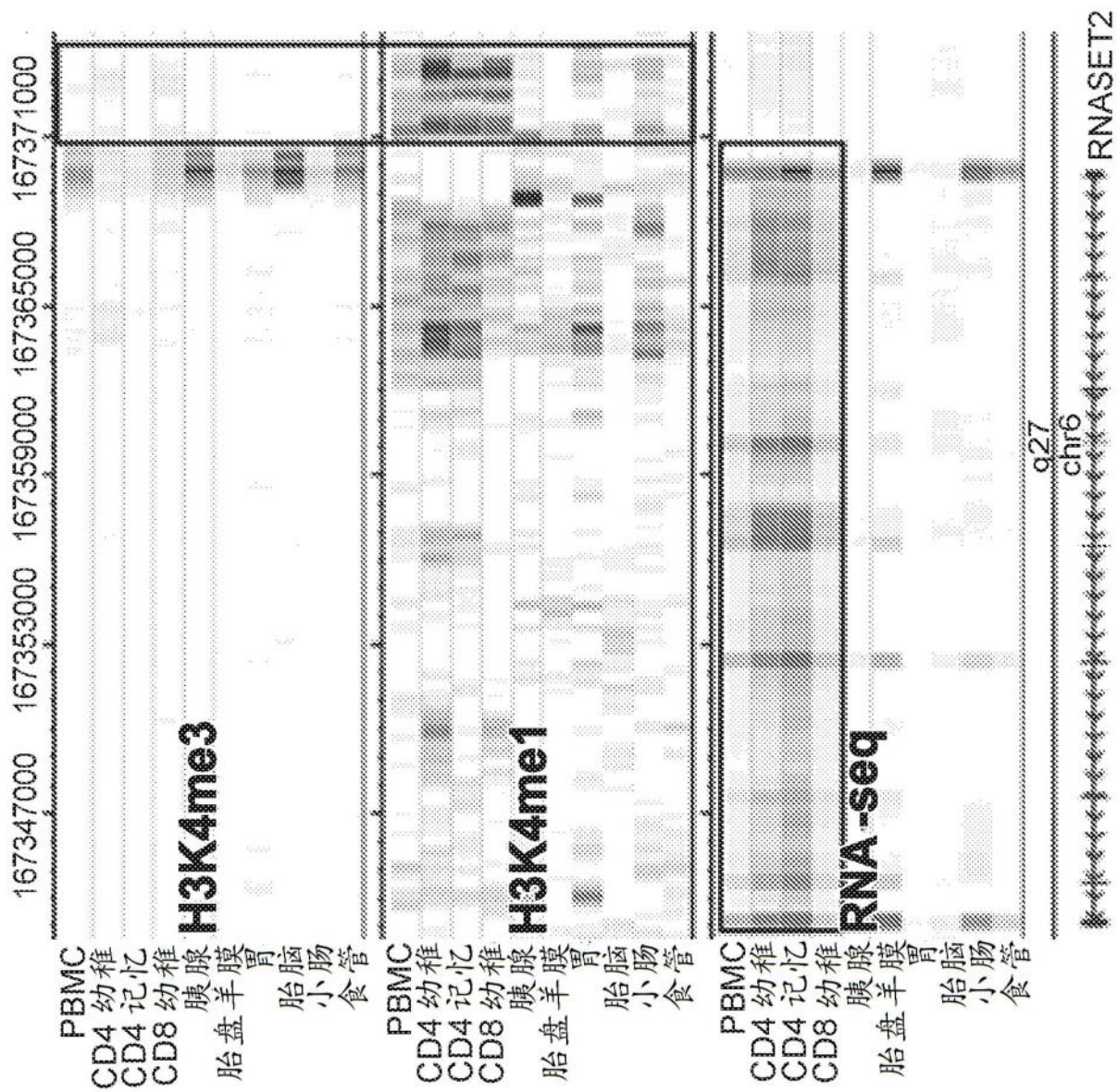


图40

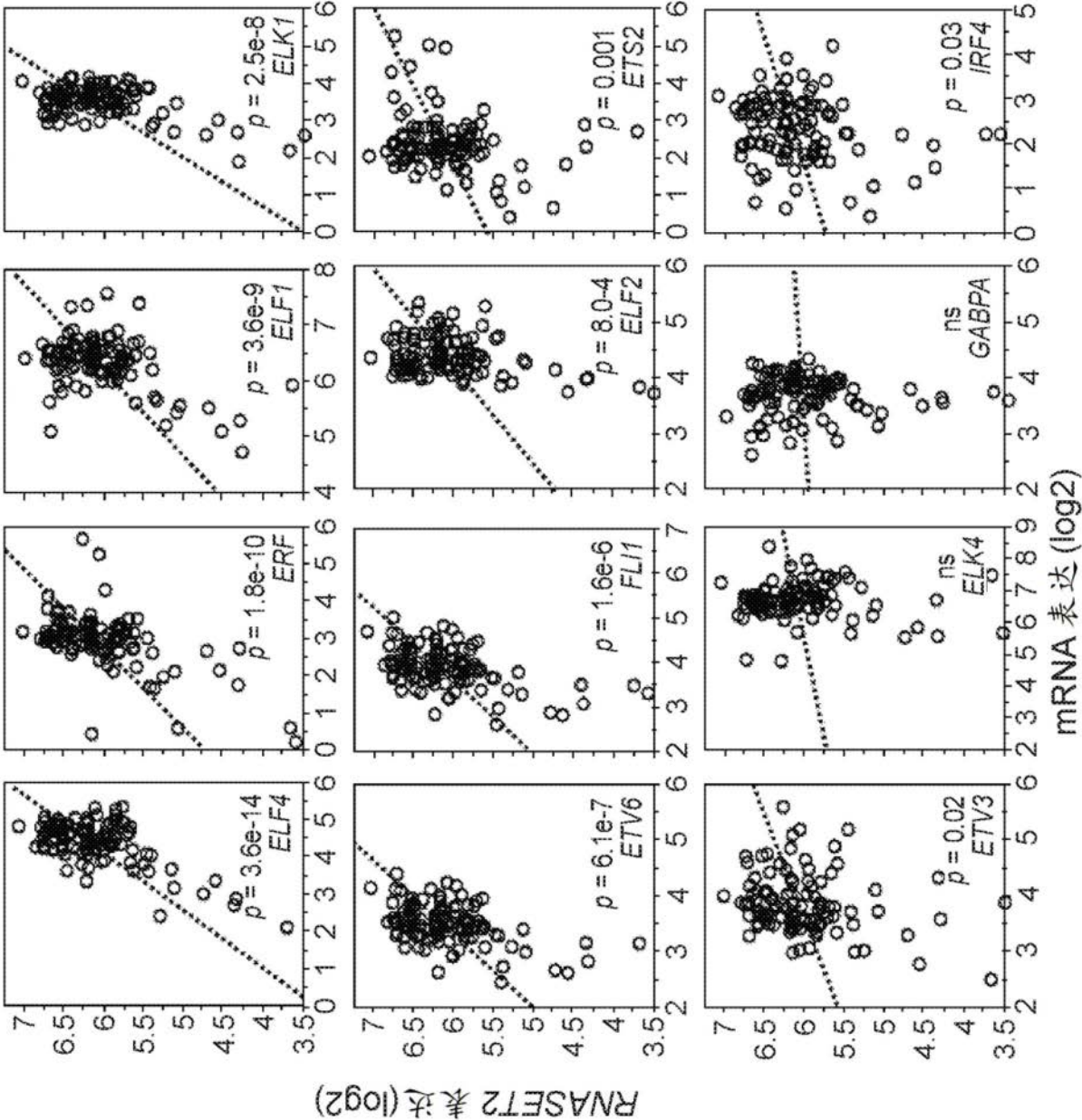


图41

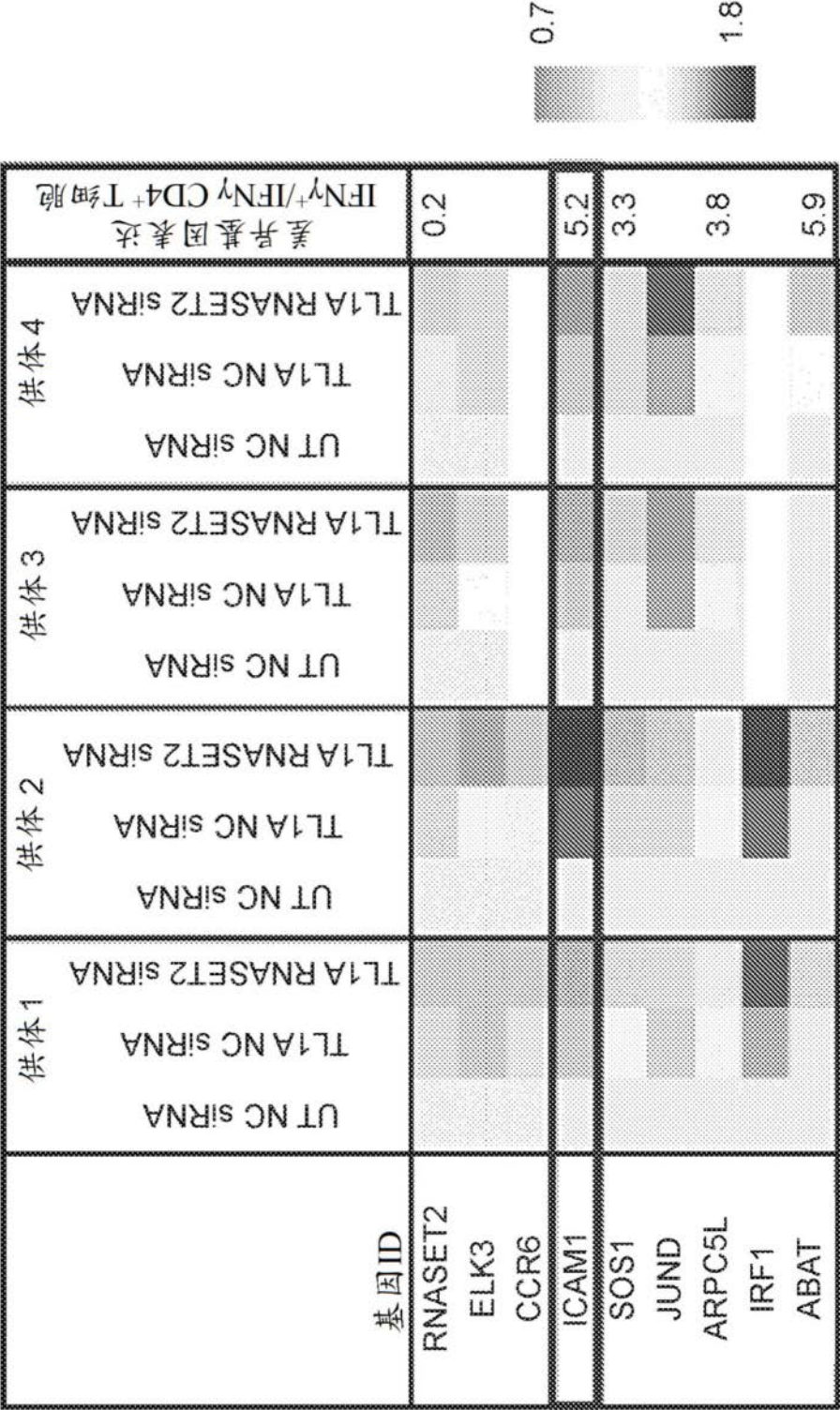


图42

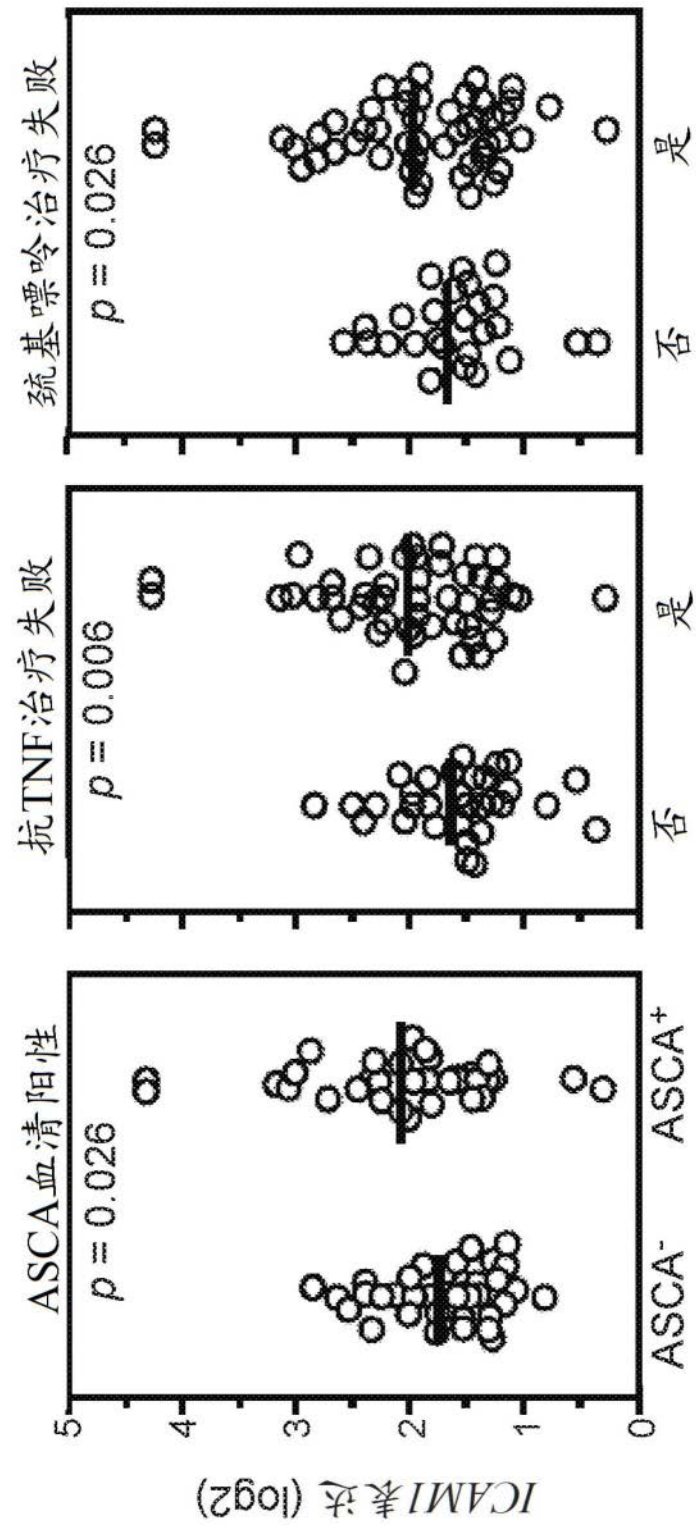


图43