



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118541481 A

(43) 申请公布日 2024.08.23

(21) 申请号 202280060863.0

J·B·理查兹

(22) 申请日 2022.07.29

(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

63/230,707 2021.08.07 US

专利代理师 黄鑫

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.03.07

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/074307 2022.07.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/019067 EN 2023.02.16

(71) 申请人 雷杰纳荣制药公司

地址 美国纽约

申请人 皇家进修学院/麦吉尔大学

(72) 发明人 J·博维金 O·索西纳 周思睿

L·A·洛塔 A·巴拉斯

权利要求书6页 说明书39页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

用分化簇109 (CD109) 抑制剂治疗骨矿物质
密度降低的方法

(57) 摘要

本公开提供了治疗患有骨矿物质密度降低
或处于发展出骨矿物质密度降低的风险中的受
试者的方法,以及鉴定具有增加的发展出骨矿物
质密度降低风险的受试者的方法。

1. 一种治疗患有骨矿物质密度降低或处于发展出骨矿物质密度降低的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用分化簇109 (CD109) 抑制剂。

2. 一种治疗患有骨质减少或处于发展出骨质减少的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用分化簇109 (CD109) 抑制剂。

3. 一种治疗患有I型骨质疏松症或处于发展出I型骨质疏松症的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用分化簇109 (CD109) 抑制剂。

4. 一种治疗患有II型骨质疏松症或处于发展出II型骨质疏松症的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用分化簇109 (CD109) 。

5. 一种治疗患有继发性骨质疏松症或处于发展出继发性骨质疏松症的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用分化簇109 (CD109) 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CD109抑制剂包含与CD109核酸分子杂交的抑制性核酸分子。

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含反义核酸分子、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CD109抑制剂包含与CD109基因组核酸分子内的指导RNA (gRNA) 识别序列杂交的Cas蛋白和gRNA。

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识别序列位于SEQ ID NO:1 内。

11. 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至约6个核苷酸处。

12. 根据权利要求8至11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。

13. 根据权利要求8至11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:37-58中任一个的核苷酸序列。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其还包括检测来自所述受试者的生物样品中存在或不存在编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子。

15. 根据权利要求14所述的方法,其还包括以标准剂量向受试者施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,其中所述CD109错义变体核酸分子不存在于所述生物样品中。

16. 根据权利要求14所述的方法,其还包括以同于或低于标准剂量的剂量向对于所述CD109错义变体核酸分子是杂合的受试者施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂。

17. 根据权利要求14至16中任一项所述的方法,其中所述CD109预测的错义变体核酸分子是剪接位点变体、终止获得变体、起始丧失变体、终止丧失变体、移码变体或框内插入缺失变体,或编码截短的CD109预测的功能丧失多肽的变体。

18. 根据权利要求14至17中任一项所述的方法,其中所述CD109预测的功能丧失变体核酸分子是6:73730573:A:G、6:73823473:GA:G、6:73763607:C:A、6:73803256:G:T、6:73818486:T:C、6:73787379:G:A、6:73771510:A:G、6:73806987:A:T、6:73758991:A:G、6:73823456:A:G 6:73762778:A:C、6:73763660:A:G、6:73730573:A:G、6:73806956:G:A、6:73792628:G:C、6:73806926:A:T、6:73771576:G:A、6:73815026:C:T、6:73765952:G:A、或由

其产生的mRNA分子、或由所述mRNA分子产生的cDNA分子。

19. 根据权利要求17所述的方法,其中所述CD109错义变体核酸分子编码截短的CD109预测的功能丧失多肽。

20. 一种用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂治疗受试者的方法,其中所述受试者患有骨矿物质密度降低或处于发展出骨矿物质密度降低的风险中,所述方法包括以下步骤:

通过以下方式确定所述受试者是否具有编码分化簇109 (CD109) 预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子:

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CD109错义变体核酸分子的基因型;以及以标准剂量向作为CD109参考的受试者施用或继续施用所述治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,和/或向所述受试者施用CD109抑制剂;

以同于或低于标准剂量的量向对于所述CD109错义变体核酸分子是杂合的受试者施用或继续施用所述治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,和/或向所述受试者施用CD109抑制剂;或

以同于或低于标准剂量的量向对于所述CD109错义变体核酸分子是纯合的受试者施用或继续施用所述治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂;

其中具有编码所述CD109预测的功能丧失多肽的所述CD109错义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出骨矿物质密度降低的风险。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述受试者是CD109参考,并且以标准剂量向所述受试者施用或继续施用所述治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,且施用CD109抑制剂。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中所述受试者对于CD109错义变体核酸分子是杂合的,并且以同于或低于标准剂量的量向所述受试者施用或继续施用所述治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,且施用CD109抑制剂。

23. 根据权利要求20至22中任一项所述的方法,其中所述CD109错义变体核酸分子是剪接位点变体、终止获得变体、起始丧失变体、终止丧失变体、移码变体或框内插入缺失变体,或编码截短的CD109预测的功能丧失多肽的变体。

24. 根据权利要求20至23中任一项所述的方法,其中所述CD109预测的功能丧失变体核酸分子是6:73730573:A:G、6:73823473:GA:G、6:73763607:C:A、6:73803256:G:T、6:73818486:T:C、6:73787379:G:A、6:73771510:A:G、6:73806987:A:T、6:73758991:A:G、6:73823456:A:G 6:73762778:A:C、6:73763660:A:G、6:73730573:A:G、6:73806956:G:A、6:73792628:G:C、6:73806926:A:T、6:73771576:G:A、6:73815026:C:T、6:73765952:G:A、或由其产生的mRNA分子、或由所述mRNA分子产生的cDNA分子。

25. 根据权利要求20至23中任一项所述的方法,其中所述CD109错义变体核酸分子编码截短的CD109预测的功能丧失多肽。

26. 根据权利要求20至25中任一项所述的方法,其中所述CD109抑制剂包含与CD109核酸分子杂交的抑制性核酸分子。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述抑制性核酸分子包含反义核酸分子、小干扰

RNA (siRNA) 或短发夹RNA (shRNA)。

28. 根据权利要求20至25中任一项所述的方法,其中所述CD109抑制剂包含与CD109基因组核酸分子内的指导RNA (gRNA) 识别序列杂交的Cas蛋白和gRNA。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述Cas蛋白是Cas9或Cpf1。

30. 根据权利要求28或权利要求29所述的方法,其中所述gRNA识别序列位于SEQ ID NO:1内。

31. 根据权利要求28或权利要求29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至约6个核苷酸处。

32. 根据权利要求28至31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。

33. 根据权利要求28至31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:37-58中任一个的核苷酸序列。

34. 根据权利要求20至33中任一项所述的方法,其中所述骨矿物质密度降低是骨质减少。

35. 根据权利要求20至33中任一项所述的方法,其中所述骨矿物质密度降低是I型骨质疏松症。

36. 根据权利要求20至33中任一项所述的方法,其中所述骨矿物质密度降低是II型骨质疏松症。

37. 根据权利要求20至33中任一项所述的方法,其中所述骨矿物质密度降低是继发性骨质疏松症。

38. 根据权利要求20至33中任一项所述的方法,其中所述治疗剂选自阿仑膦酸盐、伊班膦酸盐、唑来膦酸盐、利塞膦酸盐、降钙素、特立帕肽、地舒单抗、雌激素和黄体酮、雷洛昔芬或其任何组合。

39. 一种鉴定具有增加的发展出骨矿物质密度降低的风险的受试者的方法,所述方法包括:

确定或已经确定在从所述受试者获得的生物样品中存在或不存在编码分化簇109 (CD109) 预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子;

其中:

当所述受试者是CD109参考时,则所述受试者具有增加的发展出骨矿物质密度降低的风险;并且

当所述受试者对于编码所述CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的或纯合的时,则所述受试者具有降低的发展出骨矿物质密度降低的风险。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述CD109错义变体核酸分子是剪接位点变体、终止获得变体、起始丧失变体、终止丧失变体、移码变体或框内插入缺失变体,或编码截短的CD109预测的功能丧失多肽的变体。

41. 根据权利要求39或权利要求40所述的方法,其中所述CD109预测的功能丧失变体核酸分子是6:73730573:A:G、6:73823473:GA:G、6:73763607:C:A、6:73803256:G:T、6:73818486:T:C、6:73787379:G:A、6:73771510:A:G、6:73806987:A:T、6:73758991:A:G、6:73823456:A:G 6:73762778:A:C、6:73763660:A:G、6:73730573:A:G、6:73806956:G:A、6:

73792628:G:C、6:73806926:A:T、6:73771576:G:A、6:73815026:C:T、6:73765952:G:A、或由其产生的mRNA分子、或由所述mRNA分子产生的cDNA分子。

42. 根据权利要求39或权利要求40所述的方法,其中所述CD109错义变体核酸分子编码截短的CD109预测的功能丧失多肽。

43. 根据权利要求39至42中任一项所述的方法,其中所述受试者是CD109参考,并且以标准剂量向所述受试者施用或继续施用所述治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,且施用CD109抑制剂。

44. 根据权利要求39至42中任一项所述的方法,其中所述受试者对于CD109错义变体核酸分子是杂合的,并且以同于或低于标准剂量的量向所述受试者施用或继续施用所述治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,且施用CD109抑制剂。

45. 根据权利要求43或权利要求44所述的方法,其中所述CD109抑制剂包含与CD109核酸分子杂交的抑制性核酸分子。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述抑制性核酸分子包含反义核酸分子、小干扰RNA(siRNA)或短发夹RNA(shRNA)。

47. 根据权利要求43或权利要求44所述的方法,其中所述CD109抑制剂包含与CD109基因组核酸分子内的指导RNA(gRNA)识别序列杂交的Cas蛋白和gRNA。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中所述Cas蛋白是Cas9或Cpf1。

49. 根据权利要求47或权利要求48所述的方法,其中所述gRNA识别序列位于SEQ ID NO:1内。

50. 根据权利要求47或权利要求48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至约6个核苷酸处。

51. 根据权利要求46至50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。

52. 根据权利要求46至51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:37-58中任一个的核苷酸序列。

53. 根据权利要求39至52中任一项所述的方法,其中所述骨矿物质密度降低是骨质减少。

54. 根据权利要求39至52中任一项所述的方法,其中所述骨矿物质密度降低是I型骨质疏松症。

55. 根据权利要求39至52中任一项所述的方法,其中所述骨矿物质密度降低是II型骨质疏松症。

56. 根据权利要求39至52中任一项所述的方法,其中所述骨矿物质密度降低是继发性骨质疏松症。

57. 根据权利要求39至52中任一项所述的方法,其中所述治疗剂选自阿仑膦酸盐、伊班膦酸盐、唑来膦酸盐、利塞膦酸盐、降钙素、特立帕肽、地舒单抗、雌激素和黄体酮、雷洛昔芬或其任何组合。

58. 一种治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,其用于治疗受试者的骨矿物质密度降低,所述受试者具有:

编码分化簇109(CD109)预测的功能丧失多肽的CD109错义变体基因组核酸分子;

编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体mRNA分子;或
编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体cDNA分子。

59. 根据权利要求58所述的方法,其中所述骨矿物质密度降低是骨质减少。

60. 根据权利要求58所述的方法,其中所述骨矿物质密度降低是I型骨质疏松症。

61. 根据权利要求58所述的方法,其中所述骨矿物质密度降低是II型骨质疏松症。

62. 根据权利要求58所述的方法,其中所述骨矿物质密度降低是继发性骨质疏松症。

63. 根据权利要求58所述的方法,其中所述治疗剂选自阿仑膦酸盐、伊班膦酸盐、唑来膦酸盐、利塞膦酸盐、降钙素、特立帕肽、地舒单抗、雌激素和黄体酮、或雷洛昔芬。

64. 一种用于治疗受试者的骨矿物质密度降低的分化簇109 (CD109) 抑制剂,所述受试者:

a) 对于CD109基因组核酸分子、CD109 mRNA分子或CD109cDNA分子是参考;或

b) 对于以下各项是杂合的:

i) 编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体基因组核酸分子;

ii) 编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体mRNA分子;或

iii) 编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体cDNA分子。

65. 根据权利要求64所述的方法,其中所述骨矿物质密度降低是骨质减少。

66. 根据权利要求64所述的方法,其中所述骨矿物质密度降低是I型骨质疏松症。

67. 根据权利要求64所述的方法,其中所述骨矿物质密度降低是II型骨质疏松症。

68. 根据权利要求64所述的方法,其中所述骨矿物质密度降低是继发性骨质疏松症。

69. 根据权利要求64所述的方法,其中所述治疗剂选自阿仑膦酸盐、伊班膦酸盐、唑来膦酸盐、利塞膦酸盐、降钙素、特立帕肽、地舒单抗、雌激素和黄体酮、雷洛昔芬或其任何组合。

70. 根据权利要求64至69中任一项所述的方法,其中所述CD109抑制剂包含与CD109核酸分子杂交的抑制性核酸分子。

71. 根据权利要求70所述的方法,其中所述抑制性核酸分子包含反义核酸分子、小干扰RNA (siRNA) 或短发夹RNA (shRNA)。

72. 根据权利要求64至69中任一项所述的方法,其中所述CD109抑制剂包含与CD109基因组核酸分子内的指导RNA (gRNA) 识别序列杂交的Cas蛋白和gRNA。

73. 根据权利要求72所述的方法,其中所述Cas蛋白是Cas9或Cpf1。

74. 根据权利要求72或权利要求73所述的方法,其中所述gRNA识别序列位于SEQ ID NO:1内。

75. 根据权利要求72或权利要求73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至约6个核苷酸处。

76. 根据权利要求72至75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。

77. 根据权利要求72至76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:37-58中任一个的核苷酸序列。

78. 根据权利要求58至77中任一项所述的方法,其中所述CD109预测的功能丧失变体核酸分子是6:73730573:A:G、6:73823473:GA:G、6:73763607:C:A、6:73803256:G:T、6:

73818486:T:C、6:73787379:G:A、6:73771510:A:G、6:73806987:A:T、6:73758991:A:G、6:73823456:A:G 6:73762778:A:C、6:73763660:A:G、6:73730573:A:G、6:73806956:G:A、6:73792628:G:C、6:73806926:A:T、6:73771576:G:A、6:73815026:C:T、6:73765952:G:A、或由其产生的mRNA分子、或由所述mRNA分子产生的cDNA分子。

用分化簇109 (CD109) 抑制剂治疗骨矿物质密度降低的方法

[0001] 序列表的引用

[0002] 本申请包括以电子方式作为XML文件提交的序列表,其命名为18923807402SEQ,创建于2022年7月28日,大小为355千字节。所述序列表以引用的方式并入本文。

技术领域

[0003] 本公开总体涉及用分化簇109 (CD109) 抑制剂治疗患有骨矿物质密度降低的受试者,以及鉴定具有增加的发展出骨矿物质密度降低风险的受试者的方法。

背景技术

[0004] 骨的退行性病状可使个体易患骨折、骨痛和其他并发症。骨的一种显著退行性病状为骨质减少和骨质疏松症。骨矿物质密度降低(骨质减少)是骨的一种病状,其严重程度比骨质疏松症轻并且特征在于由于骨损失的速率大于新骨生长的速率而导致的骨量减少。骨质减少表现在骨中矿物质密度低于正常峰值骨矿物质密度,但不如骨质疏松症中发现的低。骨质减少可由肌肉活动减少引起,这可能因骨折、卧床休息、骨折固定、关节重建、关节炎等而发生。骨质疏松症是一种特征在于由于骨脱矿质和/或其结构问题导致的渐进的骨弱化的疾病。骨质疏松症表现为骨更容易断裂。与妇女更年期相关的激素缺乏和由于两性老化导致的激素缺乏导致骨的退行性病状。此外,对骨生长和维持所必需的矿物质的饮食摄取不足是骨损失的潜在原因。遗传对骨质疏松症的影响也有报道(Morris等人,Nature Genet.,2019,51,258-266)。

[0005] 通过再现肌肉使用对骨骼的一些作用,可以减缓、停止、甚至逆转骨质减少的影响。这通常涉及机械应力对骨的影响的一些应用或模拟。用于治疗骨质减少或骨质疏松症的化合物包括诱导骨生长或延缓骨脱矿质的药物制品,或补充饮食以增补损失的骨矿物质的矿物质复合物。女性的低雌激素水平和男性的低雄激素水平是导致各性别骨质疏松症的主要激素缺乏症。其他激素诸如甲状腺激素、孕酮和睾酮有助于骨健康。因此,上述激素化合物已被合成开发,或从非哺乳动物来源中提取,并复合到用于治疗骨质疏松症的疗法中。含有碘、锌、锰、硼、锶、维生素D3、钙、镁、维生素K、磷和铜的矿物质补充制品也用于补充此类矿物质的饮食摄取不足。然而,长期激素疗法具有不期望的副作用,诸如增加的癌症风险。另外,目前还不确定所提出的许多矿物质和荷尔蒙补充剂是否真的可以降低骨折风险。此外,使用许多合成或非哺乳动物激素的疗法具有另外的不期望的副作用,诸如心血管病症的风险增加、神经病症或先前存在的病状的恶化。

[0006] 分化簇109 (CD109) 是含有硫酯的蛋白质 α 2-巨球蛋白/补体 (AMCOM) 家族的成员。这种糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 连接的糖蛋白定位于血小板、活化T细胞和内皮细胞的表面。另外,CD109在造血细胞谱系和一些上皮细胞中表达。CD109蛋白与角质形成细胞中的转化生长因子 β (TGF- β) 结合并借此负向调控信号传导,并且还和TGF- β R1和TGF- β R2相关。此外,CD109可像AMCOM家族的大多数成员一样充当蛋白酶抑制剂。

发明内容

[0007] 本公开提供了治疗患有骨矿物质密度降低或处于发展出骨矿物质密度降低的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用CD109抑制剂。

[0008] 本公开还提供了治疗患有骨质减少或处于发展出骨质减少的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用CD109抑制剂。

[0009] 本公开还提供了治疗患有I型骨质疏松症或处于发展出I型骨质疏松症的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用CD109抑制剂。

[0010] 本公开还提供了治疗患有II型骨质疏松症或处于发展出II型骨质疏松症的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用CD109。

[0011] 本公开还提供了治疗患有继发性骨质疏松症或处于发展出继发性骨质疏松症的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用CD109抑制剂。

[0012] 本公开还提供了用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂治疗受试者的方法,其中受试者患有骨矿物质密度降低或处于发展出骨矿物质密度降低的风险中,所述方法包括以下步骤:通过以下方式确定受试者是否具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子:从受试者获得或已经获得生物样品;以及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编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子的基因型;以及i)以标准剂量向作为CD109参考的受试者施用或继续施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,和/或向受试者施用CD109抑制剂;ii)以同于或低于标准剂量的量向对于CD109错义变体核酸分子是杂合的受试者施用或继续施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,和/或向受试者施用CD109抑制剂;或iii)以同于或低于标准剂量的量向对于CD109错义变体核酸分子是纯合的受试者施用或继续施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂;其中具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义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出骨矿物质密度降低的风险。

[0013] 本公开还提供了鉴定具有增加的发展出骨矿物质密度降低的风险的受试者的方法,所述方法包括:确定或已经确定在从受试者获得的生物样品中存在或不存在编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子;当受试者是CD109参考时,则受试者具有增加的发展出骨矿物质密度降低的风险;并且当受试者对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的或纯合的时,则受试者具有降低的发展出骨矿物质密度降低的风险。

[0014] 本公开还提供了治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,其用于治疗具有以下各项的受试者的骨矿物质密度降低:编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体基因组核酸分子;编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体mRNA分子;或编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体cDNA分子。

[0015] 本公开还提供了用于治疗受试者的骨矿物质密度降低的CD109抑制剂,所述受试者:a)对于CD109基因组核酸分子、CD109 mRNA分子或CD109 cDNA分子是参考;或b)对于以下各项是杂合的:i)编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体基因组核酸分子;ii)编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体mRNA分子;或iii)编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体cDNA分子。

具体实施方式

[0016] 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。

[0017] 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。

[0018] 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。

[0019] 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。

[0020] 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”。

[0021] 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,诸如二聚体或替代地磷酸化或衍生化形式的相同核酸分子或多肽。

[0022] 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。

[0023] 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。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,人是在医生护理下的患者。

[0024] 根据本公开观察到,编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子(无论这些变异在特定受试者中是纯合的还是杂合的)与降低的发展出骨矿物质密度降低的风险相关。CD109参与骨矿物质密度的细节或方向性尚不清楚。本文提供的数据首次表明CD109中罕见的非同义/功能丧失变体与降低的发展出骨矿物质密度降低的风险相关。因此,可用CD109抑制剂治疗作为CD109参考或对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的受试者,从而抑制骨矿物质密度降低、减轻其症状,和/或抑制症状的发展。还据信患有骨矿物质密度降低的此类受试者可进一步用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂进行治疗。

[0025] 出于本公开的目的,任何特定的受试者诸如人都可归类为具有以下三种CD109基因型之一:i) CD109参考;ii) 对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分

子是杂合的;或iii)对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是纯合的。当受试者不具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子的拷贝时,所述受试者是CD109参考。当受试者具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子的单个拷贝时,所述受试者对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的。编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义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变体CD109多肽的任何核酸分子(诸如基因组核酸分子、mRNA分子或cDNA分子)。具有部分功能丧失(或预测的部分功能丧失)的CD109多肽的受试者对于CD109是亚效等位基因的。当受试者具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子的两个拷贝(相同的或不同的)时,所述受试者对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是纯合的。

[0026] 对于基因分型或确定为CD109参考的受试者,此类受试者具有增加的发展出骨矿物质密度降低,诸如骨质减少、I型骨质疏松症、II型骨质疏松症和/或继发性骨质疏松症的风险。对于基因分型或确定为CD109参考或对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的受试者,可用CD109抑制剂治疗此类受试者。

[0027] 在本文所述的任何实施方案中,编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子可以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CD109变体多肽的任何核酸分子(诸如例如基因组核酸分子、mRNA分子或cDNA分子)。在一些实施方案中,与参考CD109相比,编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子与对CD109配体的体外反应降低相关。在一些实施方案中,编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是与参考基因组序列相比导致或预测会导致CD109多肽过早截短的CD109变体。在一些实施方案中,编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是通过体外预测算法,诸如Polyphen、SIFT或类似算法预测为有害的变体。在一些实施方案中,编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是导致或预测会导致CD109中的非同义氨基酸取代的变体,并且其等位基因频率小于从中选择受试者的群体中等位基因的1/100。在一些实施方案中,编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是任何罕见错义变体(等位基因频率<0.1%;或1,000个等位基因中有1个),或任何剪接位点、终止获得、起始丧失、终止丧失、移码或框内插入缺失,或其他移码CD109变体。

[0028] 在本文所述的任何实施方案中,CD109预测的功能丧失多肽可以是具有部分功能丧失、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任何CD109多肽。

[0029] 在本文所述的任何实施方案中,编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子可包括使用CD109参考基因组核酸分子的核苷酸序列(SEQ ID NO:1; ENSG00000156535.15; GRCh38/hg38人类基因组组装中的chr6:73,695,785-73,828,316)作为参考序列的染色体6的位置处的变异。

[0030] CD109中存在许多遗传变体,从而导致CD109多肽序列的后续变化,所述变体包括但不限于:6:73730573:A:G、6:73823473:GA:G(p.Ser1394fs、p.Ser1317fs、p.Ser1377fs)、6:73763607:C:A(p.Phe343Leu、p.Phe266Leu、p.Phe343Leu)、6:73803256:G:T(p.Gly972Val、p.Gly895Val、p.Gly972Val)、6:73818486:T:C(p.Val11337Ala、p.Val11260Ala、p.Val11320Ala)、6:73787379:G:A(p.Gly828Glu、p.Gly751Glu、

p.Gly828Glu)、6:73771510:A:G(p.Ile586Val、p.Ile509Val、p.Ile586Val)、6:73806987:A:T(p.His1035Leu、p.His958Leu、p.His1035Leu)、6:73758991:A:G(p.Met241Val、p.Met164Val、p.Met241Val)、6:73823456:A:G 6:73762778:A:C(p.Glu298Ala、p.Glu221Ala、p.Glu298Ala)、6:73763660:A:G(p.Lys361Arg、p.Lys284Arg、p.Lys361Arg)、6:73730573:A:G(p.Lys169Arg、p.Lys169Arg)、6:73806956:G:A(p.Gly1025Ser、p.Gly948Ser、p.Gly1025Ser)、6:73792628:G:C(p.Asp902His、p.Asp825His、p.Asp902His)、6:73806926:A:T(p.Thr1015Ser、p.Thr938Ser、p.Thr1015Ser)、6:73771576:G:A(p.Glu608Lys、p.Glu531Lys、p.Glu608Lys)、6:73815026:C:T(p.Arg1272*、p.Arg1195*、p.Arg1255*)、6:73765952:G:A(p.Gly377Asp、p.Gly300Asp、p.Gly377Asp)。

[0031] 编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子中的任一种或多种(即,任何组合)可用于本文所述的任何方法中以确定受试者是否具有增加的发展出骨矿物质密度降低的风险。特定变体的组合可形成用于统计分析CD109的特定相关性和增加发展出骨矿物质密度降低的风险的掩码。

[0032] 在本文所述的任何实施方案中,骨矿物质密度降低是骨质减少、I型骨质疏松症、II型骨质疏松症和/或继发性骨质疏松症。在一些实施方案中,骨矿物质密度降低是骨质减少。在一些实施方案中,骨矿物质密度降低是I型骨质疏松症。在一些实施方案中,骨矿物质密度降低是II型骨质疏松症。在一些实施方案中,骨矿物质密度降低是继发性骨质疏松症。

[0033] 骨矿物质密度降低的症状包括但不限于骨脆性增加(表现为由轻度至中度创伤导致的骨折)、骨密度降低、局部骨痛和断骨区域的虚弱、身高下降或姿势改变(诸如弯腰)、血液检查时血清钙或碱性磷酸酶水平高、维生素D缺乏和关节或肌肉疼痛或其任何组合。

[0034] 本公开提供了治疗患有骨矿物质密度降低或处于发展出骨矿物质密度降低的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用CD109抑制剂。

[0035] 本公开还提供了治疗患有骨质减少或处于发展出骨质减少的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用CD109抑制剂。

[0036] 本公开还提供了治疗患有I型骨质疏松症或处于发展出I型骨质疏松症的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用CD109抑制剂。

[0037] 本公开还提供了治疗患有II型骨质疏松症或处于发展出II型骨质疏松症的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用CD109。

[0038] 本公开还提供了治疗患有继发性骨质疏松症或处于发展出继发性骨质疏松症的风险中的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用CD109抑制剂。

[0039] 在一些实施方案中,CD109抑制剂包含抑制性核酸分子。抑制性核酸分子的实例包括但不限于反义核酸分子、小干扰RNA(siRNA)和短发夹RNA(shRNA)。此类抑制性核酸分子可以设计成靶向CD109核酸分子的任何区域。在一些实施方案中,反义RNA、siRNA或shRNA与CD109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CD109多肽的表达。在一些实施方案中,CD109抑制剂包含与CD109基因组核酸分子或mRNA分子杂交并降低受试者的细胞中的CD109多肽的表反义分子。在一些实施方案中,CD109抑制剂包含与CD109基因组核酸分子或mRNA分子杂交并降低受试者细胞中CD109多肽的表达的siRNA。在一些实施方案中,CD109抑制剂包含与CD109基因组核酸分子或mRNA分子杂交并降低受试者细胞中CD109多肽的表达的shRNA。

[0040] 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生成。术语“标记”也可指“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生成可检测信号。例如,生物素可与辣根过氧化物(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。多种标记包括例如颗粒,荧光团,半抗原,酶以及其量热、荧光和化学发光底物和其他标记。

[0041] 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。

[0042] 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(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、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)、4-硫代尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、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、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。

[0043] 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;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可为取代或未取代的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、ON O₂、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

[0054] 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、腺相关病毒(AAV)、植物病毒(诸如花椰菜花叶病毒和烟草花叶病毒)、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。

[0055] 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。

[0056] 在一些实施方案中,CD109抑制剂是或包含LY294002,其是抑制CD109表达的PI3K抑制剂。

[0057] 在一些实施方案中,CD109抑制剂包含在(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与CD109基因组核酸分子内的识别序列结合的DNA结合蛋白。识别序列可以位于CD109基因的编码区内,或影响基因表达的调控区内。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。所述识别序列可包括或接近CD109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、约20、约30、约40、约50、约100、约200、约300、约400、约500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,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。

[0058] 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,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。

[0059] 在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统可用于修饰细胞内的CD109基因组核酸分子。本文公开的方法和组合物可通过利用CRISPR复合物(包含与Cas蛋白复合的指导RNA(gRNA))而使用CRISPR-Cas系统,用于CD109核酸分子的位点定向切割。

[0060] 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蛋白可具有完全切割活性以在CD109基因组核酸分子中产生双链断裂,或者其可以是在CD109基因组核酸分子中产生单链断裂的切口酶。Cas蛋白的另外的实例包括但不限于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,以及它们的同源物或修饰型式。Cas蛋白也可以可操作地连接至异源多肽为融合蛋白。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蛋白可以编码Cas蛋白的核酸分子,诸如RNA或DNA的形式提供。

[0061] 在一些实施方案中,CD109基因组核酸分子的靶向遗传修饰可通过使细胞与Cas蛋白和一种或多种gRNA接触来产生,所述一种或多种gRNA与所述CD109基因组核酸分子中的靶基因组基因座内的一个或多个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识别序列可包括或接近CD109基因组核酸分子的起始密码子或CD109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、约20、约30、约40、约50、约100、约200、约300、约400、约500或约1,000个核苷酸处。

[0062] CD109基因组核酸分子中的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,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。一般地,PAM在gRNA靶向的DNA序列下游约2-6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、约2个至约5个碱基对,或三个碱基对处。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'。

[0063] gRNA是与Cas蛋白结合并将Cas蛋白靶向CD109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酶结合或切割CD109基因组核酸分子的gRNA,其中gRNA包含与CD109基因组核酸分子内的gRNA识别序列杂交的DNA靶向区段。示例性gRNA包含与CD109基因组核酸分子内存在的gRNA识别序列杂交的DNA靶向区段,所述gRNA识别序列包括或接近起始密码子或终止密码子。例如,可选择gRNA以使其与位于距起始密码子约5、约10、约15、约20、约25、约30、约35、约40、约45、约50、约100、约200、约300、约400、约500或约1,000个核苷酸处或位于距终止密码子约5、约10、约15、约20、约25、约30、约35、约40、约45、约50、约100、约200、约300、约400、约500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至约25个核苷酸、约17至约23个核苷酸、约18至约22个核苷酸或约19至约21个核苷酸。在一些实施方案中,gRNA可包含20个核苷酸。

[0064] 位于人CD109参考基因内的合适gRNA识别序列的实例作为SEQ ID NO:37-58列示于表1中。

[0065] 表1:CD109附近的指导RNA识别序列

链	gRNA 识别序列	SEQ ID NO:
+	GCCTCCAAGTCCTGTCTCAAT	37
+	GGTACCATCACGGCAAAGTAT	38
+	GTACCATCACGGCAAAGTATA	39
+	GCTACAGTTGAAGGCCTATTT	40
[0066]	GATTGAAGGAGTTAAGCTATA	41
+	GGTCTTGGACTAACA ACTACT	42
+	GAAAGATGCCACTGAGGTTAA	43
+	GCATCTACTCAGGATACCACT	44
+	GGTACAGCCAACGGCAGTTAA	45
+	GGCTCTTATGGAAGTTAACCT	46
+	GACAGGCGGTGAGAAGTTACA	47
+	GCCCAGTGGTCTCAGTAGATA	48
+	GCCGATCCTTACATAGATA	49
+	CCTAGATTCTTAAGCATTAA	50
+	AAGCCTGTGTAATTGTGTA	51
+	AGAGTTCAGATCACTGCAA	52
[0067]	AGGAGACGTAACGCTTACA	53
+	TGTAAGCACTAATGTGTTC	54
+	CTGTACCTGATTCTATCAC	55
+	ACTAAGAAGTAAGTGTAAC	56
+	TGCAGAATATGCTGAGAGG	57
=	TTGGAGATGTTCTTGGTCC	58

[0068] Cas蛋白和gRNA形成复合物,并且Cas蛋白切割靶CD109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CD109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靶向区段将结合的CD109基因组核酸分子中存在的核酸序列中或附近(诸如例如来自所述核酸序列的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、20个、50个或更多个碱基对内)的一条或两条链的切割。

[0069] 此类方法可产生例如CD109基因组核酸分子,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,或者编码序列被破坏或缺失。任选地,细胞可进一步与一种或多种另外的gRNA接触,所述另外的gRNA与CD109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。通过使所述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。

[0070] 在一些实施方案中,治疗的方法还包括检测来自受试者的生物样品中存在或不存在编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子。如本公开通篇所用,“编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子”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CD109多肽的任何CD109核酸分子(诸如例如,基因组核酸分子、mRNA分子或cDNA分子)。

[0071] 本公开还提供了用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂治疗受试者的方法,其

中受试者患有骨矿物质密度降低或处于发展出骨矿物质密度降低的风险中。在一些实施方案中,受试者患有骨矿物质密度降低。在一些实施方案中,受试者处于发展出骨矿物质密度降低的风险中。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编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子: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编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子的基因型。在一些实施方案中,所述方法还包括以标准剂量向作为CD109参考的受试者施用或继续施用所述治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,和/或向所述受试者施用CD109抑制剂。在一些实施方案中,所述方法还包括以同于或低于标准剂量的量向对于所述CD109错义变体核酸分子是杂合的受试者施用或继续施用所述治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,和/或向所述受试者施用CD109抑制剂。在一些实施方案中,所述方法还包括以同于或低于标准剂量的量向对于所述CD109错义变体核酸分子是纯合的受试者施用或继续施用所述治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂。具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义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出骨矿物质密度降低的风险。在一些实施方案中,受试者是CD109参考。在一些实施方案中,受试者对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的。

[0072] 对于基因分型或确定为CD109参考或对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的受试者,可用CD109抑制剂治疗此类受试者,如本文所述。

[0073] 检测来自受试者的生物样品中存在或不存在编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子和/或确定受试者是否具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义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,核酸分子可存在于从受试者获得的细胞内。

[0074] 在一些实施方案中,当受试者是CD109参考时,以标准剂量向受试者施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂。在一些实施方案中,当受试者对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的时,以同于或低于标准剂量的剂量向受试者施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂。

[0075] 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CD109预测的功能丧失多肽的存在或不存在。在一些实施方案中,当受试者不具有CD109预测的功能丧失多肽时,以标准剂量向受试者施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂。在一些实施方案中,当受试者具有CD109预测的功能丧失多肽时,以同于或低于标准剂量的剂量向受试者施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂。

[0076] 本公开还提供了用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂治疗受试者的方法,其中受试者患有骨矿物质密度降低或处于发展出骨矿物质密度降低的风险中。在一些实施方案中,受试者患有骨矿物质密度降低。在一些实施方案中,受试者处于发展出骨矿物质密度降低的风险中。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CD109预测的功能丧失多肽:从受试者获得或已经获得生物样品,以及对生物样品进行或已经进行测定以确定受试者是否具有CD109预测的功能丧失多肽。当受试者不具有CD109预测的功能丧失多肽时,以标准剂量向受试者施用或继续施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗

剂,和/或向受试者施用CD109抑制剂。当受试者具有CD109预测的功能丧失多肽时,以同于或低于标准剂量的量向受试者施用或继续施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,和/或向受试者施用CD109抑制剂。CD109预测的功能丧失多肽的存在指示受试者具有降低的发展出骨矿物质密度降低的风险。在一些实施方案中,受试者具有CD109预测的功能丧失多肽。在一些实施方案中,受试者不具有CD109预测的功能丧失多肽。

[0077] 检测来自受试者的生物样品中存在或不存在CD109预测的功能丧失多肽和/或确定受试者是否具有CD109预测的功能丧失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。在这些实施方案中的任一项中,多肽可存在于从受试者获得的细胞内。

[0078] 治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂的实例包括但不限于:钙和维生素D补充剂(维生素D2、维生素D3和胆钙化醇),双膦酸盐药物诸如**FOSAMAX[®]**(阿仑膦酸盐)、**BONIVA[®]**(伊班膦酸盐)、**RECLAST[®]**(唑来膦酸盐)、**ACTONEL[®]**(利塞膦酸盐),**MIACALCIN[®]**、**FORTICAL[®]**和**CALCIMAR[®]**(降钙素),**FORTEO[®]**(特立帕肽),**PROLIA[®]**(地舒单抗),用雌激素和黄体酮的激素替代疗法,以及**EVISTA[®]**(雷洛昔芬)和**EVENITY[®]**(罗莫珠单抗)。在一些实施方案中,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂是维生素D2、维生素D3、胆钙化醇、阿仑膦酸盐、伊班膦酸盐、唑来膦酸盐、利塞膦酸盐、降钙素、特立帕肽、地舒单抗或雷洛昔芬。在一些实施方案中,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂是维生素D2。在一些实施方案中,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂是维生素D3。在一些实施方案中,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂是胆钙化醇。在一些实施方案中,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂是阿仑膦酸盐。在一些实施方案中,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂是伊班膦酸盐。在一些实施方案中,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂是唑来膦酸盐。在一些实施方案中,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂是利塞膦酸盐。在一些实施方案中,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂是降钙素。在一些实施方案中,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂是特立帕肽。在一些实施方案中,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂是地舒单抗。在一些实施方案中,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂是雷洛昔芬。

[0079] 在一些实施方案中,与作为CD109参考的受试者(其可接受标准剂量)相比,对于对编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的受试者,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂的剂量可减少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%或约90%(即,低于标准剂量)。在一些实施方案中,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂的剂量可减少约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。另外,与作为CD109参考的受试者相比,可以较低频率向对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的受试者进行施用。

[0080] 在一些实施方案中,与对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的受试者相比,对于对编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是纯合的受试者,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂的剂量可减少约10%、约20%、

约30%、约40%、约50%。在一些实施方案中,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂的剂量可减少约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。另外,与对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的受试者相比,在对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是纯合的受试者中,治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂的剂量可以较低频率施用。

[0081] 治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂和/或CD109抑制剂的施用可例如在一天、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。

[0082] 治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂和/或CD109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,且对其接受者基本上无害。

[0083] 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,在施用所述剂或包含所述剂的组合物后,治疗效果包括以下中的一种或多种:骨矿物质密度降低的降低/减轻,骨矿物质密度降低的严重程度的降低/减轻(诸如例如减轻或抑制骨矿物质密度降低的发展),症状和骨矿物质密度降低相关效应的降低/减轻,延迟症状和骨矿物质密度降低相关效应的发作,减轻骨矿物质密度降低相关效应的症状的严重程度,减少症状和骨矿物质密度降低相关效应的数目,减少症状和骨矿物质密度降低相关效应的潜伏期,症状和骨矿物质密度降低相关效应的改善,减少继发性症状,减少继发性感染,预防骨矿物质密度降低复发,降低复发发作的次数或频率,增加症状发作间隔的潜伏期,增加持续进展的时间,加速恢复,或增加替代治疗剂的功效或降低对替代治疗剂的抗性,和/或增加受影响宿主动物的存活时间。预防效果可包括在治疗方案的施用后完全或部分避免/抑制或延迟骨矿物质密度降低发展/进展(诸如例如完全或部分避免/抑制或延迟),以及增加受影响宿主动物的存活时间。骨矿物质密度降低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骨矿物质密度降低的受试者,延迟骨矿物质密度降低的症状或体征的发作或演变或加重或恶化,和/或预防和/或减轻骨矿物质密度降低的严重程度。

[0084] 本公开还提供了鉴定具有增加的发展出骨矿物质密度降低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在从受试者获得的生物样品中是否存在或不存在编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子(诸如基因组核酸分子、mRNA分子和/或cDNA分子)。当受试者缺乏编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子(即,受试者在基因型上被归类为CD109参考)时,则受试者具有增加的发展出骨矿物质密度降低的风险。当受试者具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体

核酸分子(即,受试者对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的或纯合的)时,则受试者具有降低的发展出骨矿物质密度降低的风险。

[0085] 与不具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子的拷贝相比,具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子的单个拷贝更能保护受试者免于发展出骨矿物质密度降低。无意受限于任何特定的理论或作用机制,据信编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子的单个拷贝(即,对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的)保护受试者免于发展出骨矿物质密度降低,并且还据信具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子的两个拷贝(即,对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义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出骨矿物质密度降低。因此,在一些实施方案中,编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义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出骨矿物质密度降低。虽然不希望受任何特定理论约束,但可能存在涉及骨矿物质密度降低的发展的其他因子或分子,其仍存在于具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子的单个拷贝的受试者中,因此导致对骨矿物质密度降低的发展的保护不太完全。

[0086] 在来自受试者的生物样品中确定受试者是否具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子和/或确定受试者是否具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义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,核酸分子可存在于从受试者获得的细胞内。

[0087] 在一些实施方案中,当受试者被鉴定为发展出骨矿物质密度降低的风险增加时,如本文所述用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,和/或CD109抑制剂治疗受试者。例如,当受试者是CD109参考,并因此具有增加的发展出骨矿物质密度降低的风险时,向受试者施用CD109抑制剂。在一些实施方案中,还向此类受试者施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂。在一些实施方案中,当受试者对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的时,以同于或低于标准剂量的剂量向受试者施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,并且还施用CD109抑制剂。在一些实施方案中,还向此类受试者施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂。在一些实施方案中,当受试者对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是纯合的时,以同于或低于标准剂量的剂量向受试者施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂。在一些实施方案中,受试者是CD109参考。在一些实施方案中,受试者对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的。在一些实施方案中,受试者对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是纯合的。

[0088] 在一些实施方案中,本文所述的任何方法还可包括确定受试者具有与发展出骨矿物质密度降低的风险降低相关的编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子和/或CD109预测的功能丧失变体多肽的基因负荷。基因负荷是CD109基因中所有变体的总和,其可在与骨矿物质密度降低的关联分析中进行。在一些实施方案中,受试者对于与发展出骨矿物质密度降低的风险降低相关的编码CD109预测的功能丧失多肽的一个或多个CD109错义变体核酸分子是纯合的。在一些实施方案中,受试者对于与发展出骨矿物质密度

降低的风险降低相关的编码CD109预测的功能丧失多肽的一个或多个CD109错义变体核酸分子是杂合的。关联分析的结果表明,编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子与发展出骨矿物质密度降低的风险降低相关。当受试者具有较小基因负荷时,受试者发展出骨矿物质密度降低的风险较高,并且以标准剂量向受试者施用或继续施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂。当受试者具有较大的基因负荷时,受试者发展出骨矿物质密度降低的风险较低,并且以同于或低于标准剂量的量向受试者施用或继续施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂。基因负荷越大,发展出骨矿物质密度降低的风险就越低。

[0089] 用于确定受试者基因负荷的编码CD109预测的功能丧失多肽和/或CD109预测的功能丧失变体多肽的CD109错义变体核酸分子包括但不限于6:73730573:A:G、6:73823473:GA:G (p. Ser1394fs、p. Ser1317fs、p. Ser1377fs)、6:73763607:C:A (p. Phe343Leu、p. Phe266Leu、p. Phe343Leu)、6:73803256:G:T (p. Gly972Val、p. Gly895Val、p. Gly972Val)、6:73818486:T:C (p. Val11337Ala、p. Val11260Ala、p. Val11320Ala)、6:73787379:G:A (p. Gly828Glu、p. Gly751Glu、p. Gly828Glu)、6:73771510:A:G (p. Ile586Val、p. Ile509Val、p. Ile586Val)、6:73806987:A:T (p. His1035Leu、p. His958Leu、p. His1035Leu)、6:73758991:A:G (p. Met241Val、p. Met164Val、p. Met241Val)、6:73823456:A:G 6:73762778:A:C (p. Glu298Ala、p. Glu221Ala、p. Glu298Ala)、6:73763660:A:G (p. Lys361Arg、p. Lys284Arg、p. Lys361Arg)、6:73730573:A:G (p. Lys169Arg、p. Lys169Arg)、6:73806956:G:A (p. Gly1025Ser、p. Gly948Ser、p. Gly1025Ser)、6:73792628:G:C (p. Asp902His、p. Asp825His、p. Asp902His)、6:73806926:A:T (p. Thr1015Ser、p. Thr938Ser、p. Thr1015Ser)、6:73771576:G:A (p. Glu608Lys、p. Glu531Lys、p. Glu608Lys)、6:73815026:C:T (p. Arg1272*、p. Arg1195*、p. Arg1255*)、6:73765952:G:A (p. Gly377Asp、p. Gly300Asp、p. Gly377Asp)。

[0090] 在一些实施方案中,受试者具有编码CD109预测的功能丧失多肽的任何一个或多个CD109错义变体核酸分子的基因负荷代表多个编码CD109预测的功能丧失多肽的任何CD109错义变体核酸分子的加权和。在一些实施方案中,使用存在于CD109基因中或其周围(至多10Mb)的至少约2、至少约3、至少约4、至少约5、至少约10、至少约20、至少约30、至少约40、至少约50、至少约60、至少约70、至少约80、至少约100、至少约120、至少约150、至少约200、至少约250、至少约300、至少约400、至少约500、至少约1,000、至少约10,000、至少约100,000或至少约或大于1,000,000种遗传变体计算基因负荷,其中遗传负荷是等位基因的数量乘以与骨矿物质密度降低的关联估计或每个等位基因的相关结果(例如加权负荷评分)。这可包括靠近CD109基因(基因周围至多10Mb)的任何遗传变体,无论其基因组注释如何,所述变异在遗传关联分析中显示出与骨矿物质密度降低相关性状的非零关联。在一些实施方案中,当受试者具有高于所需阈值评分的基因负荷时,受试者具有降低的发展出骨矿物质密度降低的风险。在一些实施方案中,当受试者具有低于所需阈值评分的基因负荷时,受试者具有增加的发展出骨矿物质密度降低的风险。

[0091] 在一些实施方案中,基因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,其中基因负荷的最高五分位数对应于最低风险组,并且基因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,具有较大基因负荷的受试者包括最高加权基因负荷,包括但不限于受试者群体的基因负荷的前10%、前20%、前30%、前40%或

前50%。在一些实施方案中,遗传变体包括在相关性p值范围的前10%、前20%、前30%、前40%或前50%中的与骨矿物质密度降低相关的遗传变体。在一些实施方案中,每个鉴定的遗传变体包括与骨矿物质密度降低相关的遗传变体,其p值不大于约 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 10^{-15} 。在一些实施方案中,鉴定的遗传变体包括p值小于 5×10^{-8} 的与骨矿物质密度降低相关的遗传变体。在一些实施方案中,鉴定的遗传变体包括与高风险受试者的骨矿物质密度降低相关的遗传变体,与参考群体的剩余部分相比具有以下比值比(OR):对于分布的前20%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基因负荷的受试者。基因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。

[0092] 在一些实施方案中,当受试者被鉴定为发展出骨矿物质密度降低的风险增加时,如本文所述用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,和/或CD109抑制剂治疗受试者。例如,当受试者是CD109参考,并因此具有增加的发展出骨矿物质密度降低的风险时,向受试者施用CD109抑制剂。在一些实施方案中,向此类受试者施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂。在一些实施方案中,当受试者对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的时,以同于或低于标准剂量的剂量向受试者施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,并且还施用CD109抑制剂。在一些实施方案中,受试者是CD109参考。在一些实施方案中,受试者对于编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子是杂合的。此外,当受试者因具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子而具有较低的基因负荷,并因此具有增加的发展出骨矿物质密度降低的风险时,向受试者施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂。在一些实施方案中,当受试者因具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子而具有较低的基因负荷时,以同于或高于向因具有编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子而具有较大的基因负荷的受试者施用的标准剂量的剂量向受试者施用治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂。

[0093] 可用于基因负荷分析的CD109变体包括以下中的任何一个或多个或任何组合(变体列指示染色体、碱基对中的物理基因组位置、参考等位基因和每个变体的替代等位基因,根据人类基因组参考联盟(Human Genome Reference Consortium)的人类基因组序列的构建38;编码DNA和蛋白质变化根据人类基因组变异协会(Human Genome Variation Society)命名法提供,并且参考Ensembl数据库中注释的三个CD109转录本(URL:全球“useast.ensembl.org/index.html”);表中按以下顺序报告了这三个转录本的注释:ENST00000287097:ENST00000422508:ENST00000437994):

[0094]

变体	编码 DNA 变化	蛋白质变化
6:73696217:T:C	c.2T>C:c.2T>C:c.2T>C	p.Met1?:p.Met1?:p.Met1?
6:73696249:C:T	c.34C>T:c.34C>T:c.34C>T	p.Leu12Phe:p.Leu12Phe:p.Leu12Phe
6:73696250:T:G	c.35T>G:c.35T>G:c.35T>G	p.Leu12Arg:p.Leu12Arg:p.Leu12Arg
6:73696250:TC:T	c.37delC:c.37delC:c.37delC	p.Leu13fs:p.Leu13fs:p.Leu13fs
6:73697404:C:CG	c.81dupG:c.81dupG:c.81dupG	p.Phe28fs:p.Phe28fs:p.Phe28fs
6:73697413:G:GT	c.89dupT:c.89dupT:c.89dupT	p.Thr31fs:p.Thr31fs:p.Thr31fs
6:73697434:A:G	c.109A>G:c.109A>G:c.109A>G	p.Arg37Gly:p.Arg37Gly:p.Arg37Gly
6:73697459:G:T	c.134G>T:c.134G>T:c.134G>T	p.Gly45Val:p.Gly45Val:p.Gly45Val
6:73697504:C:T	c.179C>T:c.179C>T:c.179C>T	p.Ala60Val:p.Ala60Val:p.Ala60Val

[0095]

6:73697506:G:T	c.181G>T:c.181G>T:c.181G>T	p.Glu61*:p.Glu61*:p.Glu61*
6:73697515:A:T	c.190A>T:c.190A>T:c.190A>T	p.Lys64*:p.Lys64*:p.Lys64*
6:73697534:CTG:C	c.211_212delGT:c.211_212delGT:c.211_212delGT	p.Val71fs:p.Val71fs:p.Val71fs
6:73723265:C:T	c.262C>T:c.262C>T:c.262C>T	p.Leu88Phe:p.Leu88Phe:p.Leu88Phe
6:73723278:C:G	c.275C>G:c.275C>G:c.275C>G	p.Ser92*:p.Ser92*:p.Ser92*
6:73730377:C:G	c.310C>G:c.310C>G	p.Leu104Val:p.Leu104Val
6:73730398:C:T	c.331C>T:c.331C>T	p.Gln111*:p.Gln111*
6:73730430:CT:C	c.365delT:c.365delT	p.Leu122fs:p.Leu122fs
6:73730456:C:CT	c.390dupT:c.390dupT	p.Val131fs:p.Val131fs
6:73730474:A:G	c.407A>G:c.407A>G	p.Asp136Gly:p.Asp136Gly
6:73730475:C:G	c.408C>G:c.408C>G	p.Asp136Glu:p.Asp136Glu
6:73730512:C:T	c.445C>T:c.445C>T	p.Arg149Cys:p.Arg149Cys
6:73730513:G:A	c.446G>A:c.446G>A	p.Arg149His:p.Arg149His
6:73730513:G:T	c.446G>T:c.446G>T	p.Arg149Leu:p.Arg149Leu
6:73730528:T:TA	c.461_462insA:c.461_462insA	p.Phe154fs:p.Phe154fs
6:73736444:C:G	c.569C>G:c.338C>G:c.569C>G	p.Ser190Cys:p.Ser113Cys:p.Ser190Cys
6:73736450:CT:C	c.579delT:c.348delT:c.579delT	p.Gln194fs:p.Gln117fs:p.Gln194fs
6:73736460:A:AT	c.586dupT:c.355dupT:c.586dupT	p.Ser196fs:p.Ser119fs:p.Ser196fs
6:73736462:C:G	c.587C>G:c.356C>G:c.587C>G	p.Ser196Cys:p.Ser119Cys:p.Ser196Cys
6:73736471:C:T	c.596C>T:c.365C>T:c.596C>T	p.Pro199Leu:p.Pro122Leu:p.Pro199Leu
6:73736491:A:G	c.616A>G:c.385A>G:c.616A>G	p.Ile206Val:p.Ile129Val:p.Ile206Val
6:73756670:G:A	c.661G>A:c.430G>A:c.661G>A	p.Val221Ile:p.Val144Ile:p.Val221Ile
6:73756683:G:T	c.673+1G>T:c.442+1G>T:c.673+1G>T	
6:73758949:C:T	c.679C>T:c.448C>T:c.679C>T	p.Pro227Ser:p.Pro150Ser:p.Pro227Ser
6:73758966:T:TTG	c.697_698insGT:c.466_467insGT:c.697_698insGT	p.Leu233fs:p.Leu156fs:p.Leu233fs

[0096]

6:73759007:TA:T	c.740delA:c.509delA:c.740delA	p.Asn247fs:p.Asn170fs:p.Asn247fs
6:73759013:G:A	c.743G>A:c.512G>A:c.743G>A	p.Gly248Asp:p.Gly171Asp:p.Gly248Asp
6:73759024:G:T	c.754G>T:c.523G>T:c.754G>T	p.Ala252Ser:p.Ala175Ser:p.Ala252Ser
6:73759025:C:A	c.755C>A:c.524C>A:c.755C>A	p.Ala252Glu:p.Ala175Glu:p.Ala252Glu
6:73759026:AAAGT:A	c.757_758+2delAAGT:c.526_527+2delAAGT:c.757_758+2delAAGT	p.Lys253fs:p.Lys176fs:p.Lys253fs
6:73759029:G:T	c.758+1G>T:c.527+1G>T:c.758+1G>T	
6:73762393:TG:T	c.771delG:c.540delG:c.771delG	p.Lys258fs:p.Lys181fs:p.Lys258fs
6:73762396:GAG	c.773delA:c.542delA:c.773delA	p.Lys258fs:p.Lys181fs:p.Lys258fs
6:73762400:C:T	c.775C>T:c.544C>T:c.775C>T	p.Pro259Ser:p.Pro182Ser:p.Pro259Ser
6:73762403:G:A	c.778G>A:c.547G>A:c.778G>A	p.Val260Met:p.Val183Met:p.Val260Met
6:73762409:G:A	c.784G>A:c.553G>A:c.784G>A	p.Gly262Arg:p.Gly185Arg:p.Gly262Arg
6:73762479:AGA	c.844delG:c.613delG:c.844delG	p.Thr283fs:p.Thr206fs:p.Thr283fs
6:73762481:G:A	c.855+1G>A:c.624+1G>A:c.855+1G>A	
6:73762796:AT:A	c.913delT:c.682delT:c.913delT	p.Ser305fs:p.Ser228fs:p.Ser305fs
6:73762870:GAG	c.987delA:c.756delA:c.987delA	p.Glu329fs:p.Glu252fs:p.Glu329fs
6:73762882:G:A	c.997G>A:c.766G>A:c.997G>A	p.Gly333Ser:p.Gly256Ser:p.Gly333Ser
6:73762882:G:T	c.997G>T:c.766G>T:c.997G>T	p.Gly333Cys:p.Gly256Cys:p.Gly333Cys
6:73763574:AGA	c.998-1delG:c.767-1delG:c.998-1delG	
6:73763575:G:A	c.998-1G>A:c.767-1G>A:c.998-1G>A	
6:73763575:G:C	c.998-1G>C:c.767-1G>C:c.998-1G>C	
6:73763576:G:A	c.998G>A:c.767G>A:c.998G>A	p.Gly333Asp:p.Gly256Asp:p.Gly333Asp
6:73763624:A:T	c.1046A>T:c.815A>T:c.1046A>T	p.Tyr349Phe:p.Tyr272Phe:p.Tyr349Phe
6:73763629:A:AT	c.1053dupT:c.822dupT:c.1053dupT	p.Glu352fs:p.Glu275fs:p.Glu352fs
6:73763662:C:A	c.1084C>A:c.853C>A:c.1084C>A	p.Pro362Thr:p.Pro285Thr:p.Pro362Thr
6:73763664:ATCA	c.1091_1092delTC:c.860_861delTC:c.1091_1092delTC	p.Leu364fs:p.Leu287fs:p.Leu364fs

[0097]

6:73763666:C:A	c.1088C>A:c.857C>A:c.1088C>A	p.Ser363Tyr:p.Ser286Tyr:p.Ser363Tyr
6:73765929:G:T	c.1108-1G>T:c.877-1G>T:c.1108-1G>T	
6:73765949:A:G	c.1127A>G:c.896A>G:c.1127A>G	p.Asp376Gly:p.Asp299Gly:p.Asp376Gly
6:73765957:C:T	c.1135C>T:c.904C>T:c.1135C>T	p.Gln379*:p.Gln302*:p.Gln379*
6:73765969:G:T	c.1147G>T:c.916G>T:c.1147G>T	p.Glu383*:p.Glu306*:p.Glu383*
6:73766146:C:T	c.1324C>T:c.1093C>T:c.1324C>T	p.Gln442*:p.Gln365*:p.Gln442*
6:73766155:G:A	c.1332+1G>A:c.1101+1G>A:c.1332+1G>A	
6:73766825:T:C	c.1399T>C:c.1168T>C:c.1399T>C	p.Tyr467His:p.Tyr390His:p.Tyr467His
6:73766830:C:G	c.1404C>G:c.1173C>G:c.1404C>G	p.Ile468Met:p.Ile391Met:p.Ile468Met
6:73766841:CAA:C	c.1416_1417delAA:c.1185_1186delAA:c.1416_1417delAA	p.Asp474fs:p.Asp397fs:p.Asp474fs
6:73766861:G:A	c.1434+1G>A:c.1203+1G>A:c.1434+1G>A	
6:73766946:A:G	c.1435-2A>G:c.1204-2A>G:c.1435-2A>G	
6:73766951:G:A	c.1438G>A:c.1207G>A:c.1438G>A	p.Gly480Arg:p.Gly403Arg:p.Gly480Arg
6:73766987:C:T	c.1474C>T:c.1243C>T:c.1474C>T	p.Arg492*:p.Arg415*:p.Arg492*
6:73767006:A:C	c.1493A>C:c.1262A>C:c.1493A>C	p.Tyr498Ser:p.Tyr421Ser:p.Tyr498Ser
6:73767006:A:G	c.1493A>G:c.1262A>G:c.1493A>G	p.Tyr498Cys:p.Tyr421Cys:p.Tyr498Cys
6:73767012:T:C	c.1497+2T>C:c.1266+2T>C:c.1497+2T>C	
6:73768070:C:T	c.1513C>T:c.1282C>T:c.1513C>T	p.Gln505*:p.Gln428*:p.Gln505*
6:73768071:A:C	c.1514A>C:c.1283A>C:c.1514A>C	p.Gln505Pro:p.Gln428Pro:p.Gln505Pro
6:73768110:C:CT	c.1556dupT:c.1325dupT:c.1556dupT	p.Leu519fs:p.Leu442fs:p.Leu519fs
6:73768136:C:T	c.1579C>T:c.1348C>T:c.1579C>T	p.Pro527Ser:p.Pro450Ser:p.Pro527Ser
6:73768137:C:T	c.1580C>T:c.1349C>T:c.1580C>T	p.Pro527Leu:p.Pro450Leu:p.Pro527Leu
6:73768146:G:A	c.1589G>A:c.1358G>A:c.1589G>A	p.Cys530Tyr:p.Cys453Tyr:p.Cys530Tyr
6:73768176:G:C	c.1619G>C:c.1388G>C:c.1619G>C	p.Gly540Ala:p.Gly463Ala:p.Gly540Ala
6:73768176:G:T	c.1619G>T:c.1388G>T:c.1619G>T	p.Gly540Val:p.Gly463Val:p.Gly540Val

[0098]

		3Val:p.Gly540Val
6:73768178:G:A	c.1621G>A:c.1390G>A:c.1621G>A	p.Glu541Lys:p.Glu464Lys:p.Glu541Lys
6:73768190:G:A	c.1633G>A:c.1402G>A:c.1633G>A	p.Asp545Asn:p.Asp468Asn:p.Asp545Asn
6:73768197:T:TA	c.1645dupA:c.1414dupA:c.1645dupA	p.Ile549fs:p.Ile472fs:p.Ile549fs
6:73768206:C:G	c.1649C>G:c.1418C>G:c.1649C>G	p.Pro550Arg:p.Pro473Arg:p.Pro550Arg
6:73768232:G:C	c.1674+1G>C:c.1443+1G>C:c.1674+1G>C	
6:73771427:A:G	c.1675-2A>G:c.1444-2A>G:c.1675-2A>G	
6:73771428:G:T	c.1675-1G>T:c.1444-1G>T:c.1675-1G>T	
6:73771463:C:T	c.1709C>T:c.1478C>T:c.1709C>T	p.Pro570Leu:p.Pro493Leu:p.Pro570Leu
6:73771481:T:C	c.1727T>C:c.1496T>C:c.1727T>C	p.Leu576Pro:p.Leu499Pro:p.Leu576Pro
6:73771502:C:T	c.1748C>T:c.1517C>T:c.1748C>T	p.Pro583Leu:p.Pro506Leu:p.Pro583Leu
6:73771508:C:T	c.1754C>T:c.1523C>T:c.1754C>T	p.Ser585Phe:p.Ser508Phe:p.Ser585Phe
6:73771526:C:G	c.1772C>G:c.1541C>G:c.1772C>G	p.Ala591Gly:p.Ala514Gly:p.Ala591Gly
6:73771538:G:A	c.1784G>A:c.1553G>A:c.1784G>A	p.Ser595Asn:p.Ser518Asn:p.Ser595Asn
6:73771564:G:T	c.1810G>T:c.1579G>T:c.1810G>T	p.Asp604Tyr:p.Asp527Tyr:p.Asp604Tyr
6:73780421:TA:T	c.1828-2delA:c.1597-2delA:c.1828-2delA	
6:73780423:G:T	c.1828-1G>T:c.1597-1G>T:c.1828-1G>T	
6:73780425:TG:T	c.1831delG:c.1600delG:c.1831delG	p.Val611fs:p.Val534fs:p.Val611fs
6:73780447:TA:T	c.1853delA:c.1622delA:c.1853delA	p.Asn618fs:p.Asn541fs:p.Asn618fs
6:73780458:ATTAT:A	c.1866_1869delTTTA:c.1635_1638delTTTA:c.1866_1869delTTTA	p.Tyr622fs:p.Tyr545fs:p.Tyr622fs
6:73780492:C:CT	c.1899dupT:c.1668dupT:c.1899dupT	p.Gln634fs:p.Gln557fs:p.Gln634fs
6:73781262:T:C	c.1906T>C:c.1675T>C:c.1906T>C	p.Cys636Arg:p.Cys559Arg:p.Cys636Arg
6:73781268:C:T	c.1912C>T:c.1681C>T:c.1912C>T	p.Leu638Phe:p.Leu561Phe:p.Leu638Phe
6:73781269:T:A	c.1913T>A:c.1682T>A:c.1913T>A	p.Leu638His:p.Leu561His:p.Leu638His
6:73781273:G:A	c.1917G>A:c.1686G>A:c.1917G>A	p.Trp639*:p.Trp562*:p.Trp639*

[0099]

6:73781320:G:A	c.1963+1G>A:c.1732+1G>A:c.1963+1G>A	
6:73781320:GT:G	c.1963+2delT:c.1732+2delT:c.1963+2delT	
6:73782612:A:C	c.1964-2A>C:c.1733-2A>C:c.1964-2A>C	
6:73782612:AG:A	c.1964-1delG:c.1733-1delG:c.1964-1delG	
6:73782618:CAA:C	c.1969_1970delAA:c.1738_1739delAA:c.1969_1970delAA	p.Asn657fs:p.Asn580fs:p.Asn657fs
6:73782625:G:T	c.1975G>T:c.1744G>T:c.1975G>T	p.Glu659*:p.Glu582*:p.Glu659*
6:73782696:C:CA	c.2047dupA:c.1816dupA:c.2047dupA	p.Ser683fs:p.Ser606fs:p.Ser683fs
6:73782709:C:G	c.2059C>G:c.1828C>G:c.2059C>G	p.Arg687Gly:p.Arg610Gly:p.Arg687Gly
6:73782709:C:T	c.2059C>T:c.1828C>T:c.2059C>T	p.Arg687*:p.Arg610*:p.Arg687*
6:73782716:A:AT	c.2070dupT:c.1839dupT:c.2070dupT	p.Pro691fs:p.Pro614fs:p.Pro691fs
6:73782718:T:C	c.2068T>C:c.1837T>C:c.2068T>C	p.Phe690Leu:p.Phe613Leu:p.Phe690Leu
6:73783720:C:T	c.2119C>T:c.1888C>T:c.2119C>T	p.Gln707*:p.Gln630*:p.Gln707*
6:73783723:G:T	c.2122G>T:c.1891G>T:c.2122G>T	p.Glu708*:p.Glu631*:p.Glu708*
6:73783760:G:A	c.2159G>A:c.1928G>A:c.2159G>A	p.Trp720*:p.Trp643*:p.Trp720*
6:73783761:G:C	c.2160G>C:c.1929G>C:c.2160G>C	p.Trp720Cys:p.Trp643Cys:p.Trp720Cys
6:73783761:G:T	c.2160G>T:c.1929G>T:c.2160G>T	p.Trp720Cys:p.Trp643Cys:p.Trp720Cys
6:73783765:G:T	c.2164G>T:c.1933G>T:c.2164G>T	p.Ala722Ser:p.Ala645Ser:p.Ala722Ser
6:73783771:G:T	c.2170G>T:c.1939G>T:c.2170G>T	p.Gly724Cys:p.Gly647Cys:p.Gly724Cys
6:73783772:GT:G	c.2175delT:c.1944delT:c.2175delT	p.Phe725fs:p.Phe648fs:p.Phe725fs
6:73783783:T:C	c.2182T>C:c.1951T>C:c.2182T>C	p.Ser728Pro:p.Ser651Pro:p.Ser728Pro
6:73783784:C:CT	c.2184dupT:c.1953dupT:c.2184dupT	p.Glu729fs:p.Glu652fs:p.Glu729fs
6:73783795:G:C	c.2194G>C:c.1963G>C:c.2194G>C	p.Gly732Arg:p.Gly655Arg:p.Gly732Arg
6:73783796:G:A	c.2195G>A:c.1964G>A:c.2195G>A	p.Gly732Asp:p.Gly655Asp:p.Gly732Asp
6:73783810:AC:A	c.2210delC:c.1979delC:c.2210delC	p.Thr737fs:p.Thr660fs:p.Thr737fs
6:73783817:C:T	c.2216C>T:c.1985C>T:c.2216C>T	p.Pro739Leu:p.Pro66

[0100]

		2Leu:p.Pro739Leu
6:73785363:G:A	c.2224-1G>A:c.1993-1G>A:c.2224-1G>A	
6:73785364:C:A	c.2224C>A:c.1993C>A:c.2224C>A	p.Leu742Ile:p.Leu665Ile:p.Leu742Ile
6:73785364:CT:C	c.2225delT:c.1994delT:c.2225delT	p.Leu742fs:p.Leu665fs:p.Leu742fs
6:73785365:T:C	c.2225T>C:c.1994T>C:c.2225T>C	p.Leu742Pro:p.Leu665Pro:p.Leu742Pro
6:73785382:T:C	c.2242T>C:c.2011T>C:c.2242T>C	p.Phe748Leu:p.Phe671Leu:p.Phe748Leu
6:73785385:T:C	c.2245T>C:c.2014T>C:c.2245T>C	p.Phe749Leu:p.Phe672Leu:p.Phe749Leu
6:73785408:C:A	c.2268C>A:c.2037C>A:c.2268C>A	p.Tyr756*:p.Tyr679*:p.Tyr756*
6:73785408:C:G	c.2268C>G:c.2037C>G:c.2268C>G	p.Tyr756*:p.Tyr679*:p.Tyr756*
6:73785410:C:G	c.2270C>G:c.2039C>G:c.2270C>G	p.Ser757Cys:p.Ser680Cys:p.Ser757Cys
6:73785419:G:A	c.2279G>A:c.2048G>A:c.2279G>A	p.Arg760Lys:p.Arg683Lys:p.Arg760Lys
6:73785454:A:T	c.2314A>T:c.2083A>T:c.2314A>T	p.Asn772Tyr:p.Asn695Tyr:p.Asn772Tyr
6:73785458:A:G	c.2318A>G:c.2087A>G:c.2318A>G	p.Tyr773Cys:p.Tyr696Cys:p.Tyr773Cys
6:73787237:A:T	c.2341A>T:c.2110A>T:c.2341A>T	p.Lys781*:p.Lys704*:p.Lys781*
6:73787241:T:A	c.2345T>A:c.2114T>A:c.2345T>A	p.Val782Glu:p.Val705Glu:p.Val782Glu
6:73787264:T:G	c.2368T>G:c.2137T>G:c.2368T>G	p.Phe790Val:p.Phe713Val:p.Phe790Val
6:73787271:T:G	c.2375T>G:c.2144T>G:c.2375T>G	p.Ile792Ser:p.Ile715Ser:p.Ile792Ser
6:73787330:A:T	c.2434A>T:c.2203A>T:c.2434A>T	p.Ser812Cys:p.Ser735Cys:p.Ser812Cys
6:73787338:TG:T	c.2446delG:c.2215delG:c.2446delG	p.Ala816fs:p.Ala739fs:p.Ala816fs
6:73787366:C:T	c.2470C>T:c.2239C>T:c.2470C>T	p.Pro824Ser:p.Pro747Ser:p.Pro824Ser
6:73787378:G:T	c.2482G>T:c.2251G>T:c.2482G>T	p.Gly828*:p.Gly751*:p.Gly828*
6:73787379:G:A	c.2483G>A:c.2252G>A:c.2483G>A	p.Gly828Glu:p.Gly751Glu:p.Gly828Glu
6:73787394:C:T	c.2498C>T:c.2267C>T:c.2498C>T	p.Thr833Ile:p.Thr756Ile:p.Thr833Ile
6:73787447:G:A	c.2551G>A:c.2320G>A:c.2551G>A	p.Val851Ile:p.Val774Ile:p.Val851Ile
6:73787448:T:TA	c.2555dupA:c.2324dupA:c.2555dupA	p.Ala853fs:p.Ala776fs:p.Ala853fs

[0101]

6:73787452:G:T	c.2556G>T:c.2325G>T:c.2556G>T	p.Lys852Asn;p.Lys775Asn;p.Lys852Asn
6:73788469:C:G	c.2558C>G:c.2327C>G:c.2558C>G	p.Ala853Gly;p.Ala776Gly;p.Ala853Gly
6:73788503:CT:C	c.2594delT:c.2363delT:c.2594delT	p.Leu865fs;p.Leu788fs;p.Leu865fs
6:73788564:C:T	c.2653C>T:c.2422C>T:c.2653C>T	p.Pro885Ser;p.Pro808Ser;p.Pro885Ser
6:73788565:C:T	c.2654C>T:c.2423C>T:c.2654C>T	p.Pro885Leu;p.Pro808Leu;p.Pro885Leu
6:73788582:G:A	c.2671G>A:c.2440G>A:c.2671G>A	p.Gly891Ser;p.Gly814Ser;p.Gly891Ser
6:73788588:G:T	c.2677G>T:c.2446G>T:c.2677G>T	p.Glu893*;p.Glu816*;p.Glu893*
6:73788601:T:TC	c.2691dupC:c.2460dupC:c.2691dupC	p.Thr898fs;p.Thr821fs;p.Thr898fs
6:73792622:CCAGGAG:C	c.2702-3_2704delCAGGAG:c.2471-3_2473delCAGGAG:c.2702-3_2704delCAGGAG	p.Gly901del;p.Gly824del;p.Gly901del
6:73792628:G:C	c.2704G>C:c.2473G>C:c.2704G>C	p.Asp902His;p.Asp825His;p.Asp902His
6:73792629:A:T	c.2705A>T:c.2474A>T:c.2705A>T	p.Asp902Val;p.Asp825Val;p.Asp902Val
6:73792637:G:T	c.2713G>T:c.2482G>T:c.2713G>T	p.Gly905Cys;p.Gly828Cys;p.Gly905Cys
6:73792686:G:T	c.2762G>T:c.2531G>T:c.2762G>T	p.Cys921Phe;p.Cys844Phe;p.Cys921Phe
6:73792688:G:A	c.2764G>A:c.2533G>A:c.2764G>A	p.Gly922Ser;p.Gly845Ser;p.Gly922Ser
6:73792703:A:C	c.2779A>C:c.2548A>C:c.2779A>C	p.Ile927Leu;p.Ile850Leu;p.Ile927Leu
6:73792712:G:T	c.2788G>T:c.2557G>T:c.2788G>T	p.Ala930Ser;p.Ala853Ser;p.Ala930Ser
6:73792718:A:G	c.2794A>G:c.2563A>G:c.2794A>G	p.Asn932Asp;p.Asn855Asp;p.Asn932Asp
6:73792736:T:A	c.2812T>A:c.2581T>A:c.2812T>A	p.Tyr938Asn;p.Tyr861Asn;p.Tyr938Asn
6:73792754:C:T	c.2830C>T:c.2599C>T:c.2830C>T	p.Gln944*;p.Gln867*;p.Gln944*
6:73792775:G:GA	c.2856dupA:c.2625dupA:c.2856dupA	p.Ala953fs;p.Ala876fs;p.Ala953fs
6:73792780:A:C	c.2856A>C:c.2625A>C:c.2856A>C	p.Lys952Asn;p.Lys875Asn;p.Lys952Asn
6:73792782:C:A	c.2858C>A:c.2627C>A:c.2858C>A	p.Ala953Asp;p.Ala876Asp;p.Ala953Asp
6:73792784:C:CT	c.2863dupT:c.2632dupT:c.2863dupT	p.Ser955fs;p.Ser878fs;p.Ser955fs
6:73792799:C:T	c.2875C>T:c.2644C>T:c.2875C>T	p.Gln959*;p.Gln882*;p.Gln959*

[0102]

6:73792802:G:A	c.2878G>A:c.2647G>A:c.2878G>A	p.Gly960Ser:p.Gly883Ser:p.Gly960Ser
6:73803231:G:A	c.2890G>A:c.2659G>A:c.2890G>A	p.Glu964Lys:p.Glu887Lys:p.Glu964Lys
6:73803253:A:G	c.2912A>G:c.2681A>G:c.2912A>G	p.Asp971Gly:p.Asp894Gly:p.Asp971Gly
6:73803256:G:A	c.2915G>A:c.2684G>A:c.2915G>A	p.Gly972Asp:p.Gly895Asp:p.Gly972Asp
6:73803256:G:T	c.2915G>T:c.2684G>T:c.2915G>T	p.Gly972Val:p.Gly895Val:p.Gly972Val
6:73803264:A:G	c.2923A>G:c.2692A>G:c.2923A>G	p.Ser975Gly:p.Ser898Gly:p.Ser975Gly
6:73803298:C:T	c.2957C>T:c.2726C>T:c.2957C>T	p.Thr986Ile:p.Thr909Ile:p.Thr986Ile
6:73803301:G:A	c.2960G>A:c.2729G>A:c.2960G>A	p.Trp987*:p.Trp910*:p.Trp987*
6:73806844:G:T	c.2961G>T:c.2730G>T:c.2961G>T	p.Trp987Cys:p.Trp910Cys:p.Trp987Cys
6:73806855:T:C	c.2972T>C:c.2741T>C:c.2972T>C	p.Phe991Ser:p.Phe914Ser:p.Phe991Ser
6:73806870:T:G	c.2987T>G:c.2756T>G:c.2987T>G	p.Phe996Cys:p.Phe919Cys:p.Phe996Cys
6:73806897:T:C	c.3014T>C:c.2783T>C:c.3014T>C	p.Ile1005Thr:p.Ile928Thr:p.Ile1005Thr
6:73806902:C:T	c.3019C>T:c.2788C>T:c.3019C>T	p.Gln1007*:p.Gln930*:p.Gln1007*
6:73806908:G:A	c.3025G>A:c.2794G>A:c.3025G>A	p.Val1009Met:p.Val932Met:p.Val1009Met
6:73806921:C:CA T	c.3040_3041dupTA:c.2809_2810dupTA:c.3040_3041dupTA	p.Trp1016fs:p.Trp939fs:p.Trp1016fs
6:73806956:G:A	c.3073G>A:c.2842G>A:c.3073G>A	p.Gly1025Ser:p.Gly948Ser:p.Gly1025Ser
6:73806956:G:C	c.3073G>C:c.2842G>C:c.3073G>C	p.Gly1025Arg:p.Gly948Arg:p.Gly1025Arg
6:73806981:T:A	c.3098T>A:c.2867T>A:c.3098T>A	p.Val1033Glu:p.Val956Glu:p.Val1033Glu
6:73806984:T:G	c.3101T>G:c.2870T>G:c.3101T>G	p.Ile1034Ser:p.Ile957Ser:p.Ile1034Ser
6:73806987:A:T	c.3104A>T:c.2873A>T:c.3104A>T	p.His1035Leu:p.His958Leu:p.His1035Leu
6:73807002:G:A	c.3119G>A:c.2888G>A:c.3119G>A	p.Gly1040Asp:p.Gly963Asp:p.Gly1040Asp
6:73807005:G:A	c.3122G>A:c.2891G>A:c.3122G>A	p.Gly1041Asp:p.Gly964Asp:p.Gly1041Asp
6:73807029:C:G	c.3146C>G:c.2915C>G:c.3146C>G	p.Thr1049Arg:p.Thr972Arg:p.Thr1049Arg
6:73807034:T:A	c.3151T>A:c.2920T>A:c.3151T>A	p.Tyr1051Asn:p.Tyr9

[0103]

		74Asn:p.Tyr1051Asn
6:73807035:A:G	c.3152A>G:c.2921A>G:c.3152A>G	p.Tyr1051Cys:p.Tyr974Cys:p.Tyr1051Cys
6:73807035:A:T	c.3152A>T:c.2921A>T:c.3152A>T	p.Tyr1051Phe:p.Tyr974Phe:p.Tyr1051Phe
6:73808113:T:G	c.3220T>G:c.2989T>G:c.3220T>G	p.Phe1074Val:p.Phe997Val:p.Phe1074Val
6:73808146:G:A	c.3253G>A:c.3022G>A:c.3253G>A	p.Asp1085Asn:p.Asp1008Asn:p.Asp1085Asn
6:73808153:A:T	c.3260A>T:c.3029A>T:c.3260A>T	p.Tyr1087Phe:p.Tyr1010Phe:p.Tyr1087Phe
6:73808156:C:T	c.3263C>T:c.3032C>T:c.3263C>T	p.Thr1088Ile:p.Thr1011Ile:p.Thr1088Ile
6:73808159:T:C	c.3266T>C:c.3035T>C:c.3266T>C	p.Leu1089Pro:p.Leu1012Pro:p.Leu1089Pro
6:73808176:G:T	c.3283G>T:c.3052G>T:c.3283G>T	p.Ala1095Ser:p.Ala1018Ser:p.Ala1095Ser
6:73808244:AGAAGGTAAT:A	c.3352_3355+5delGAAGGTAAT:c.3121_3124+5delGAAGGTAAT:c.3352_3355+5delGAAGGTAAT	p.Glu1118fs:p.Glu1041fs:p.Glu1118fs
6:73808245:GA:G	c.3354delA:c.3123delA:c.3354delA	p.Gly1119fs:p.Gly1042fs:p.Gly1119fs
6:73809981:CA:C	c.3356-2delA:c.3125-2delA:c.3356-2delA	
6:73809992:C:T	c.3364C>T:c.3133C>T:c.3364C>T	p.Gln1122*:p.Gln1045*:p.Gln1122*
6:73809995:T:A	c.3367T>A:c.3136T>A:c.3367T>A	p.Phe1123Ile:p.Phe1046Ile:p.Phe1123Ile
6:73810034:C:A	c.3406C>A:c.3175C>A:c.3406C>A	p.Gln1136Lys:p.Gln1059Lys:p.Gln1136Lys
6:73810044:C:T	c.3416C>T:c.3185C>T:c.3416C>T	p.Ser1139Phe:p.Ser1062Phe:p.Ser1139Phe
6:73810054:T:G	c.3426T>G:c.3195T>G:c.3426T>G	p.Ile1142Met:p.Ile1065Met:p.Ile1142Met
6:73810089:T:TA	c.3462dupA:c.3231dupA:c.3462dupA	p.Gln1155fs:p.Gln1078fs:p.Gln1155fs
6:73810106:G:A	c.3478G>A:c.3247G>A:c.3478G>A	p.Glu1160Lys:p.Glu1083Lys:p.Glu1160Lys
6:73810143:G:T	c.3515G>T:c.3284G>T:c.3515G>T	p.Arg1172Ile:p.Arg1095Ile:p.Arg1172Ile
6:73810154:G:A	c.3526G>A:c.3295G>A:c.3526G>A	p.Gly1176Ser:p.Gly1099Ser:p.Gly1176Ser
6:73810155:G:A	c.3527G>A:c.3296G>A:c.3527G>A	p.Gly1176Asp:p.Gly1099Asp:p.Gly1176A

[0104]

		sp
6:73810155:G:C	c.3527G>C:c.3296G>C:c.3527G>C	p.Gly1176Ala:p.Gly1099Ala:p.Gly1176Ala
6:73810155:G:T	c.3527G>T:c.3296G>T:c.3527G>T	p.Gly1176Val:p.Gly1099Val:p.Gly1176Val
6:73810157:G:T	c.3529G>T:c.3298G>T:c.3529G>T	p.Gly1177Cys:p.Gly1100Cys:p.Gly1177Cys
6:73810158:G:A	c.3530G>A:c.3299G>A:c.3530G>A	p.Gly1177Asp:p.Gly1100Asp:p.Gly1177Asp
6:73810172:C:T	c.3544C>T:c.3313C>T:c.3544C>T	p.Gln1182*:p.Gln1105*:p.Gln1182*
6:73810990:A:G	c.3547-2A>G:c.3316-2A>G:c.3547-2A>G	
6:73810993:A:C	c.3548A>C:c.3317A>C:c.3548A>C	p.Asp1183Ala:p.Asp1106Ala:p.Asp1183Ala
6:73811013:G:C	c.3568G>C:c.3337G>C:c.3568G>C	p.Ala1190Pro:p.Ala1113Pro:p.Ala1190Pro
6:73811013:G:T	c.3568G>T:c.3337G>T:c.3568G>T	p.Ala1190Ser:p.Ala1113Ser:p.Ala1190Ser
6:73811029:C:A	c.3584C>A:c.3353C>A:c.3584C>A	p.Ala1195Glu:p.Ala1118Glu:p.Ala1195Glu
6:73811051:GA:G	c.3607delA:c.3376delA:c.3607delA	p.Thr1203fs:p.Thr1126fs:p.Thr1203fs
6:73811110:T:C	c.3665T>C:c.3434T>C	p.Ile1222Thr:p.Ile1145Thr
6:73811120:CA:C	c.3677delA:c.3446delA	p.Asn1226fs:p.Asn1149fs
6:73811121:A:T	c.3676A>T:c.3445A>T	p.Asn1226Tyr:p.Asn1149Tyr
6:73812271:G:A	c.3768+1G>A:c.3537+1G>A:c.3717+1G>A	
6:73812271:G:C	c.3768+1G>C:c.3537+1G>C:c.3717+1G>C	
6:73812271:G:T	c.3768+1G>T:c.3537+1G>T:c.3717+1G>T	
6:73812272:T:A	c.3768+2T>A:c.3537+2T>A:c.3717+2T>A	
6:73814990:GTA:G	c.3783_3784delTA:c.3552_3553delTA:c.3732_3733delTA	p.Tyr1261fs:p.Tyr1184fs:p.Tyr1244fs
6:73814994:A:G	c.3782A>G:c.3551A>G:c.3731A>G	p.Tyr1261Cys:p.Tyr1184Cys:p.Tyr1244Cys
6:73815026:C:T	c.3814C>T:c.3583C>T:c.3763C>T	p.Arg1272*:p.Arg1195*:p.Arg1255*

[0105]

6:73815098:CAT:C	c.3887_3888delAT:c.3656_3657delAT:c.3836_3837delAT	p.His1296fs:p.His1219fs:p.His1279fs
6:73815113:G:A	c.3901G>A:c.3670G>A:c.3850G>A	p.Val1301Met:p.Val1224Met:p.Val1284Met
6:73815117:G:A	c.3905G>A:c.3674G>A:c.3854G>A	p.Cys1302Tyr:p.Cys1225Tyr:p.Cys1285Tyr
6:73818386:A:G	c.3912-2A>G:c.3681-2A>G:c.3861-2A>G	
6:73818413:A:G	c.3937A>G:c.3706A>G:c.3886A>G	p.Met1313Val:p.Met1236Val:p.Met1296Val
6:73818415:G:C	c.3939G>C:c.3708G>C:c.3888G>C	p.Met1313Ile:p.Met1236Ile:p.Met1296Ile
6:73818417:C:A	c.3941C>A:c.3710C>A:c.3890C>A	p.Ala1314Asp:p.Ala1237Asp:p.Ala1297Asp
6:73818423:T:G	c.3947T>G:c.3716T>G:c.3896T>G	p.Met1316Arg:p.Met1239Arg:p.Met1299Arg
6:73818425:G:A	c.3949G>A:c.3718G>A:c.3898G>A	p.Glu1317Lys:p.Glu1240Lys:p.Glu1300Lys
6:73818443:G:T	c.3967G>T:c.3736G>T:c.3916G>T	p.Gly1323Cys:p.Gly1246Cys:p.Gly1306Cys
6:73818450:TG:T	c.3976delG:c.3745delG:c.3925delG	p.Val1326fs:p.Val1249fs:p.Val1309fs
6:73818456:CT:C	c.3982delT:c.3751delT:c.3931delT	p.Ser1328fs:p.Ser1251fs:p.Ser1311fs
6:73818479:G:T	c.4003G>T:c.3772G>T:c.3952G>T	p.Glu1335*:p.Glu1258*:p.Glu1318*
6:73820459:A:G	c.4060-2A>G:c.3829-2A>G:c.4009-2A>G	
6:73820480:G:C	c.4079G>C:c.3848G>C:c.4028G>C	p.Cys1360Ser:p.Cys1283Ser:p.Cys1343Ser
6:73820528:A:T	c.4127A>T:c.3896A>T:c.4076A>T	p.Asp1376Val:p.Asp1299Val:p.Asp1359Val
6:73820537:T:C	c.4136T>C:c.3905T>C:c.4085T>C	p.Val1379Ala:p.Val1302Ala:p.Val1362Ala
6:73820549:A:C	c.4148A>C:c.3917A>C:c.4097A>C	p.Asp1383Ala:p.Asp1306Ala:p.Asp1366Ala
6:73820549:A:G	c.4148A>G:c.3917A>G:c.4097A>G	p.Asp1383Gly:p.Asp1306Gly:p.Asp1366Gly
6:73820549:AT:A	c.4150delT:c.3919delT:c.4099delT	p.Tyr1384fs:p.Tyr130

		7fs:p.Tyr1367fs
6:73823456:A:G	c.4163-2A>G:c.3932-2A>G:c.4112-2A>G	
6:73823473:GA:G	c.4180delA:c.3949delA:c.4129delA	p.Ser1394fs:p.Ser1317fs:p.Ser1377fs
6:73823481:A:G	c.4186A>G:c.3955A>G:c.4135A>G	p.Asn1396Asp:p.Asn1319Asp:p.Asn1379Asp
6:73823485:C:G	c.4190C>G:c.3959C>G:c.4139C>G	p.Ser1397Cys:p.Ser1320Cys:p.Ser1380Cys
[0106] 6:73823530:GC:G	c.4236delC:c.4005delC:c.4185delC	p.Cys1413fs:p.Cys1336fs:p.Cys1396fs
6:73823534:C:A	c.4239C>A:c.4008C>A:c.4188C>A	p.Cys1413*:p.Cys1336*:p.Cys1396*
6:73823583:A:AT	c.4293dupT:c.4062dupT:c.4242dupT	p.Ile1432fs:p.Ile1355fs:p.Ile1415fs
6:73823592:TTC:T	c.4299_4300delCT:c.4068_4069delCT:c.4248_4249delCT	p.Phe1433fs:p.Phe1356fs:p.Phe1416fs
6:73823612:C:A	c.4317C>A:c.4086C>A:c.4266C>A	p.Tyr1439*:p.Tyr1362*:p.Tyr1422*

[0107] 本公开还提供了检测来自受试者的生物样品中存在或不存在编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子(即基因组核酸分子、mRNA分子或由mRNA分子产生的cDNA分子)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CD109变体基因组核酸分子、CD109变体mRNA分子和CD109变体cDNA分子的序列仅为示例性序列。CD109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。

[0108] 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、淋巴液、腹水、囊液或尿液。在一些情况下,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,当检测任何编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子时,可采用被设计用于分离基因组DNA或使生物样品富集所述基因组DNA的初步处理。多种技术可用于此目的。当检测任何CD109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基因座的存在。

[0109] 在一些实施方案中,检测受试者中的编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子包括对从受试者获得的生物样品进行序列分析以确定生物样品中的CD109基因组核酸分子、和/或生物样品中的CD109 mRNA分子、和/或由生物样品中的mRNA分子产生的CD109 cDNA分子是否包含导致功能丧失(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。

[0110] 在一些实施方案中,检测受试者中存在或不存在编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体核酸分子(诸如例如基因组核酸分子、mRNA分子和/或由mRNA分子产生的

cDNA分子)的方法包括对从受试者获得的生物样品进行测定。所述测定确定生物样品中的核酸分子是否包含特定的核苷酸序列。

[0111] 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CD109基因组核酸分子或mRNA分子的生物样品,并且如果是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CD109核酸分子的这些位置的身份。在一些实施方案中,所述方法是体外方法。

[0112] 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CD109基因组核酸分子、CD109 mRNA分子或CD109 cDNA分子的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中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。

[0113] 在一些实施方案中,测定包括对整个核酸分子进行测序。在一些实施方案中,仅分析CD109基因组核酸分子。在一些实施方案中,仅分析CD109 mRNA。在一些实施方案中,仅分析从CD109 mRNA获得的CD109 cDNA。

[0114] 改变特异性聚合酶链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。

[0115] 在一些实施方案中,样品中的核酸分子是mRNA,且在扩增步骤之前将所述mRNA逆转录成cDNA。在一些实施方案中,核酸分子存在于从受试者获得的细胞内。

[0116] 在一些实施方案中,所述测定包括使生物样品与引物或探针,诸如改变特异性引物或改变特异性探针接触,所述引物或探针在严格条件下与CD109变体基因组序列、变体mRNA序列或变体cDNA序列特异性杂交,而不是与对应的CD109参考序列特异性杂交,以及确定是否发生杂交。

[0117] 在一些实施方案中,确定步骤、检测步骤或序列分析包括:a) 扩增编码CD109多肽的核酸分子的至少一部分;b) 用可检测标记来标记扩增的核酸分子;c) 使标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触;以及d) 检测可检测标记。

[0118] 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反应(RT-PCR)将mRNA逆转录成cDNA。

[0119] 在一些实施方案中,所述方法利用核苷酸长度足以与靶核苷酸序列结合并特异性地检测和/或鉴定包含CD109变体基因组核酸分子、变体mRNA分子或变体cDNA分子的多核苷酸的探针和引物。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邻接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。

[0120] 核酸测序技术的例示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

酶链反应 (PCR)、连接酶链反应 (LCR)、链置换扩增反应 (SDA) 以及基于核酸序列的扩增反应 (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)。

[0121] 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。

[0122] 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至50个核苷酸)是至少约30°C,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。

[0123] 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。

[0124] 在一些实施方案中,此类分离的核酸分子在严格条件下与CD109错义变体核酸分子(诸如基因组核酸分子、mRNA分子和/或cDNA分子)杂交。此类核酸分子可用作例如本文描述或例示的探针、引物、改变特异性探针或改变特异性引物,并且包括但不限于引物、探针、反义RNA、shRNA和siRNA,其各自在本文其他各处更详细地描述,并且可用于本文所述的任何方法中。

[0125] 在一些实施方案中,分离的核酸分子与同CD109错义变体基因组核酸分子、CD109错义变体mRNA分子和/或CD109错义变体cDNA分子具有至少约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%同一性的核酸分子的至少约15个邻接核苷酸杂交。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。

[0126] 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。

[0127] 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。

[0128] 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。

[0129] 本文所述的探针和引物可用于检测本文所公开的CD109变体错义基因组核酸分子、CD109错义变体mRNA分子和/或CD109错义变体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CD109错义变体基因组核酸分子、CD109错义变体mRNA分子或CD109错义变体cDNA分子,或其片段。

[0130] 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CD109参考基因组核酸分子、CD109参考mRNA分子和/或CD109参考cDNA分子的核酸序列杂交。

[0131] 在一些实施方案中,探针(诸如例如,改变特异性探针)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。

[0132] 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。

[0133] CD109参考基因组核酸分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:1中(ENSG00000156535.15;GRCh38/hg38人类基因组组装中的chr6:73,695,785-73,828,316)。

[0134] CD109参考mRNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:2中。另一种CD109参考mRNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:3中。另一种CD109参考mRNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:4中。另一种CD109参考mRNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:5中。另一种CD109参考mRNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:6中。另一种CD109参考mRNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:7中。另一种CD109参考mRNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:8中。另一种CD109参考mRNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:9中。另一种CD109参考mRNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:10中。另一种CD109参考mRNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:11中。另一种CD109参考mRNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:12中。另一种CD109参考mRNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:13中。另一种CD109参考mRNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:14中。另一种CD109参考mRNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:15中。另一种CD109参考mRNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:16中。

[0135] CD109参考cDNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:17中。另一种CD109参考cDNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:18中。另一种CD109参考cDNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:19中。另一种CD109参考cDNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:20中。另一种CD109参考cDNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:21中。另一种CD109参考cDNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:22中。另一种CD109参考cDNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:23中。另一种CD109参考cDNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:24中。另一种CD109参考cDNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:25中。另一种CD109参考cDNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:26中。另一种CD109参考cDNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:27中。另一种CD109参考cDNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:28中。另一种CD109参考cDNA分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:29中。

[0136] CD109参考多肽的氨基酸序列列示于SEQ ID NO:30中,并且长度为1,428个氨基酸。另一种CD109参考多肽的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:31中,并且长度为1,368个氨基酸。另一种CD109参考多肽的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:32中,并且长度为1,445个氨基酸。另一种CD109参考多肽的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:33中,并且长度为665个氨基酸。另一种CD109参考多肽的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:34中,并且长度为1,374个氨基酸。另一种CD109参考多肽的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:35中,并且长度为854个氨基酸。另一种CD109参考多肽的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:36中,并且长度为847个氨基酸。

[0137] 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。

[0138] 本文还提供了可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

多核苷酸可充当靶分子所具有的特定活性的影响剂、抑制剂、调节剂和刺激剂,或者功能性多核苷酸可具有独立于任何其他分子的全新活性。

[0139] 本文公开的分离的核酸分子可包括RNA、DNA或RNA和DNA两者。所述分离的核酸分子还可连接或融合至异源核酸序列(诸如在载体中)或异源标记。例如,本文所公开的分离的核酸分子可在载体中或作为包含分离的核酸分子和异源核酸序列的外源供体序列。分离的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生成。术语“标记”也可指“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生成可检测信号。例如,生物素可与辣根过氧化物(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。多种标记包括例如颗粒,荧光团,半抗原,酶以及其量热、荧光和化学发光底物和其他标记。

[0140] 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,如果对序列同一性百分比进行参考,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。

[0141] 如本文所用,当在对特定核苷酸或核苷酸序列或位置的编号的语境中使用,短语“对应于”或其语法变型是指当将特定核苷酸或核苷酸序列与参考序列进行比较时对指定参考序列的编号(诸如例如SEQ ID NO:1)。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其所比对的参考序列来进行的。

[0142] 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。

[0143] 本公开还提供了治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂,其用于治疗具有以下各项的受试者的骨矿物质密度降低:编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体基因组

核酸分子;编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体mRNA分子;或编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体cDNA分子。本文所述的治疗或抑制骨矿物质密度降低的任何治疗剂均可用于这些方法中。受试者可能患有骨矿物质密度降低、骨质减少、I型骨质疏松症、II型骨质疏松症或继发性骨质疏松症或具有发展出所述病状的风险。

[0144] 本公开还提供了治疗或抑制骨矿物质密度降低的治疗剂的用途,其用于制备用于治疗具有以下各项的受试者的骨矿物质密度降低的药物:编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体基因组核酸分子;编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体mRNA分子;或编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体cDNA分子。本文所述的治疗或抑制骨矿物质密度降低的任何治疗剂均可用于这些方法中。受试者可能患有骨矿物质密度降低、骨质减少、I型骨质疏松症、II型骨质疏松症或继发性骨质疏松症或具有发展出所述病状的风险。

[0145] 本公开还提供了用于治疗受试者的骨矿物质密度降低的CD109抑制剂,所述受试者:a)对于CD109基因组核酸分子、CD109 mRNA分子或CD109 cDNA分子是参考;或b)对于以下各项是杂合的:i)编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体基因组核酸分子;ii)编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体mRNA分子;或iii)编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体cDNA分子。本文所述的任何CD109抑制剂均可用于这些方法中。受试者可能患有骨矿物质密度降低、骨质减少、I型骨质疏松症、II型骨质疏松症或继发性骨质疏松症或具有发展出所述病状的风险。

[0146] 本公开还提供了CD109抑制剂在制备用于治疗受试者的骨矿物质密度降低的药物中的用途,所述受试者:a)对于CD109基因组核酸分子、CD109 mRNA分子或CD109 cDNA分子是参考;或b)对于以下各项是杂合的:i)编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体基因组核酸分子;ii)编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体mRNA分子;或iii)编码CD109预测的功能丧失多肽的CD109错义变体cDNA分子。本文所述的任何CD109抑制剂均可用于这些方法中。受试者可能患有骨矿物质密度降低、骨质减少、I型骨质疏松症、II型骨质疏松症或继发性骨质疏松症或具有发展出所述病状的风险。

[0147] 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。

[0148] 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。

[0149] 实施例

[0150] 一般方法

[0151] 英国生物样本库队列描述

[0152] 在英国 (UK) 生物样本库 (UKB) 中检查了遗传关联。UKB是年龄在40至69岁之间且在2006-2010年间经由英国22家检测中心招募的个体的基于群体的队列。使用了UKB中近300,000名欧洲血统参与者的遗传和表型信息。

[0153] 表型定义

[0154] 与足跟定量超声有关的数据是从UKB中提取的。eBMD性状值(以 g/cm^2 计)是使用声速(SOS)和骨超声衰减(BUA; $eBMD = 0.002592 \times (BUA + SOS) - 3.687$)的组合得出的。针对SOS(如果 $SOS \leq 1,450$ 或 $\geq 1,700$ m/s(男性), $\leq 1,455$ 或 $\geq 1,700$ m/s(女性), 则排除受试者)、BUA(如果 $BUA \leq 27$ 或 ≥ 138 dB/MHz(男性), ≤ 22 或 ≥ 138 dB/MHz(女性), 则排除)和eBMD(如果 ≤ 0.18 或 ≥ 1.06 g/cm^2 (男性), ≤ 0.12 或 ≥ 1.025 g/cm^2 (女性), 则排除)实施性别特异性质量控制措施。eBMD的表型值首先使用基于秩的逆正态变换进行变换, 应用于每个血统组并分别应用于男性和女性, 并且针对与eBMD相关的精细映射的常见遗传变体进行调整。

[0155] 基因型数据

[0156] 如先前描述的那样进行高覆盖率全外显子组测序(Dewey等人, *Science*, 2016, 354, aaf6814; 和Van Hout等人, *Nature*, 2020, 586, 749-756)并总结如下。可从Integrated DNA Technologies (IDT)获得的xGen设计的修改版本用于外显子组的靶序列捕获。在文库制备期间向每个DNA片段添加独特的10bp条形码(IDT)以促进多重外显子组捕获和测序。在进行外显子组捕获之前合并等量样品。在Illumina NovaSeq仪器上使用75bp双端读段进行测序。测序的覆盖深度(即, 覆盖基因组靶区中的每个核苷酸的序列读段的数目)足以在99%的IDT样品中提供对90%的靶碱基的大于20x覆盖。数据处理步骤包括使用Illumina软件进行样品分用(de-multiplexing), 与GRCh38人类基因组参考序列进行比对, 包括生成二进制比对和映射文件(BAM), 处理BAM文件(例如标记重复读段和其他读段映射评价)。使用GLNexus系统进行变体调用(Lin等人, *bioRxiv*, 2018, 343970)。变体映射和注释是基于GRCh38人类基因组参考序列和使用snEff软件的Ensembl v85基因定义。然后通过选择对于每个基因最有害的功能效应类别, 将涉及具有注释的起始和终止的蛋白编码转录本的snEff预测组合成单个功能影响预测。这些注释的等级(从最有害到最不有害)是移码、终止获得、终止丧失、剪接受体、剪接供体、终止丢失(stop-lost)、框内插入缺失、错义、其他注释。预测的LoF遗传变体包括:a) 导致移码的插入或缺失, b) 导致引入提前终止密码子或转录起始位点或终止位点丧失的插入、缺失或单核苷酸变体, 和c) 供体或受体剪接位点的变体。针对可能的功能影响根据使用SIFT(Vaser等人, *Nature Protocols*, 2016, 11, 1-9)、Polyphen2_HDIV和Polyphen2_HVAR(Adzhubei等人, *Nat. Methods*, 2010, 7, 248-249)、LRT(Chun等人, *Genome Res.*, 2009, 19, 1553-1561)和MutationTaster(Schwarz等人, *Nat. Methods*, 2010, 7, 575-576)预测有害性的计算机预测算法对错义变体进行分类。对于每个基因, 每个变体的替代等位基因频率(AAF)和功能注释确定包含在7次基因负荷暴露中: 1) AAF<1%的pLOF变体; 2) 通过5/5算法预测为有害的, AAF<1%的pLOF或错义变体; 3) 通过5/5算法预测为有害的, AAF<0.1%的pLOF或错义变体; 4) 通过至少1/5算法预测为有害

的,AAF<1%的pLOF或错义变体;5)通过至少1/5算法预测为有害的,AAF<0.1%的pLOF或错义变体;6)AAF<1%的pLOF或任何错义;7)AAF<0.1%的pLOF或任何错义变体。

[0157] CD109中的罕见pLOF与错义变异的基因负荷的关联分析

[0158] 通过使用REGENIE v1.0拟合的线性回归模型(包括针对近似基因组亲属关系矩阵的多基因评分的调整),检查了CD109中的罕见预测的功能丧失或错义变体的负荷与eBMD之间的关联(Mbatchou等人,Nature Genetics,2021)。分析根据年龄、年龄²、性别、年龄与性别和年龄²与性别交互项、实验批次相关协变量、十个常见变体衍生主成分和二十个罕见变体衍生主成分进行调整。使用单一变体,并使用基因负荷测试进行关联分析。在基因负荷测试中,如果所有个体都携带一个或多个合格的罕见变体(如上基于频率和功能注释所述),则将所有个体标记为杂合子,而如果所有个体携带纯合状态的任何合格变体,则将所有个体标记为纯合子。然后使用这种“复合基因型”来测试关联性。

[0159] eBMD致病基因的效应指数

[0160] 已在文献的其他各处描述了效应指数,一种新型的机器学习算法(Forgetta等人,bioRxiv:2021,2020.2006.2028.171561)。通过对十一种疾病和性状(2型糖尿病、低密度脂蛋白胆固醇水平、成人身高、钙水平、甲状腺功能减退、甘油三酯水平、葡萄糖水平、红细胞计数、收缩压、舒张压和直接胆红素水平)进行GWAS分析来生成训练数据。对每个GWAS数据集进行精细映射,并将基因组注释用作使用梯度提升树算法(XGBoost)预测精细映射的GWAS基因座处的阳性对照基因的特征。然后在CD109基因座处的精细映射和注释的eBMD关联数据上测试这种经过训练的算法,以测试CD109基因是此基因座上影响eBMD的基因的概率。

[0161] 循环CD109的孟德尔随机化分析

[0162] 使用两样本孟德尔随机化(MR)来检查遗传预测的循环CD109与eBMD之间的关联。此方法使用与CD109蛋白浓度相关的常见遗传变体(称为蛋白质数量性状基因座或pQTL)作为工具变量。在先前公布的两项研究中鉴定了先导CD109顺式-pQTL,所述研究在INTERVAL(N=3,301)和AGES(N=3,200)队列中进行(Sun等人,Nature,2018,558,73-79;以及Emilsson等人,Science,2018,eaq1327)。此分析的pQTL-结果关联是从UKB先前公布的eBMD GWAS中提取的,并且使用TwoSampleMR R包用Wald比率方法来进行MR分析。进行共定位分析以探讨连锁不平衡混杂的影响。这需要评估CD109蛋白浓度的遗传关联信号是否可能与CD109处的eBMD遗传关联信号共享相同的因果变体。这些共定位分析是使用两种先前公布的算法来实现的:Coloc(Giambartolomei等人,PLOS Genetics,2014,10,e1004383)和eCAVIAR(Hormozdiari等人,Am.J.Hum.Genet.,2016,99,1245-1260)。

[0163] 实施例1:CD109的功能丧失与较高的估计骨矿物质密度相关

[0164] 对英国生物样本库(UKB)的278,807名欧洲血统个体进行全外显子组测序,以鉴定基因组中每个基因的预测的功能丧失(pLoF)和错义遗传变体。检查了UKB中每个测序基因和遗传变体与估计骨矿物质密度(eBMD,使用足跟超声波测量)的关联。eBMD是一种常用的骨密度和强度生物标志物,并且与使用双能X射线吸收测定法(DXA)技术测量的骨矿物质密度高度相关。较低的骨密度水平与较高的骨质疏松性骨折风险密切相关。

[0165] UKB中的全外显子组分析发现,CD109基因中罕见(替代等位基因频率[AAF]<1%)pLoF变体的负荷与0.18个标准差单位较高的eBMD相关(P值=1.20×10⁻⁰⁹,满足Bonferroni

校正的全外显子组统计显著性阈值, $P < 3.6 \times 10^{-7}$ (对20,000个基因和七个变体聚合模型进行校正) (表2; 关联估计与AAF < 1%的CD109 pLoF变体的负荷有关, 并在UKB中得出)。

[0166] 表2: CD109中的罕见pLoF变体与较高的eBMD的关联。

[0167]	eBMD 的以 SD 单位计的每个等位基因 β (95% CI)	eBMD 的以 g/cm^2 单位计的每个等位基因 β (95% CI)	P 值	基因型计数, RR RA AA 基因型	AAF
	0.18 (0.12, 0.24)	0.022 (0.015, 0.029)	1.20×10^{-09}	277945 862 0	0.0015

[0168] 基因型计数指示三种基因型类别中每一种基因型类别的个体数量: RR指示在CD109中不携带罕见pLoF变体的个体; RA指示在单个CD109等位基因中携带罕见pLoF变体的个体; AA指示在两个CD109等位基因中携带罕见pLoF变体的个体。AAF指示在此分析中包括的pLoF变体的替代等位基因频率。 g/cm^2 , 克/平方厘米; SD, 标准偏差; CI, 置信区间。

[0169] 在检查CD109中罕见pLoF或预测破坏性错义变体的基因负荷时, CD109变体与较高的eBMD的关联也很显著(表3; 关联估计与AAF < 1%或 < 0.1%的CD109 pLoF或预测破坏性错义变体的负荷有关, 并在UKB中得出(有关用于鉴定预测破坏性错义变体的计算机算法的描述, 参见下面的基因型数据))。这些遗传数据表明, CD109的功能丧失会导致人eBMD较高。

[0170] 表3: CD109中的罕见pLoF或错义变体与较高的eBMD的关联

[0171]	遗传暴露	eBMD 的以 SD 单位计的每个等位基因 β (95% CI)	eBMD 的以 g/cm^2 单位计的每个等位基因 β (95% CI)	P 值	基因型计数, RR RA AA 基因型	AAF
	pLoF 或破坏性错义变体, AAF < 1%	0.07 (0.04, 0.09)	0.008 (0.005, 0.011)	7.0×10^{-08}	273953 4846 8	0.0087
	pLoF 或破坏性错义变体, AAF < 0.1%	0.11 (0.08, 0.15)	0.014 (0.009, 0.018)	3.2×10^{-09}	276693 2114 0	0.0038

[0172] 基因型计数指示三种基因型类别中每一种基因型类别的个体数量: RR指示在CD109中不携带罕见pLoF变体的个体; RA指示在单个CD109等位基因中携带罕见pLoF或破坏性错义变体的个体; AA指示在两个CD109等位基因中携带罕见pLoF变体或破坏性错义变体的个体。AAF, 此分析中包括的变体的替代等位基因频率。 g/cm^2 , 克每平方厘米; SD, 标准偏差; CI, 置信区间。

[0173] 实施例2: 与血液中较低CD109蛋白浓度相关的变体也与较高的eBMD相关

[0174] 使用孟德尔随机化, 发现由于CD109基因座中的常见遗传变体而导致的较低循环CD109蛋白(由CD109基因编码)与较高的eBMD相关(表4; CD109的先导顺式蛋白数量性状基因座(pQTL)在两个独立队列中获得: INTERVAL和AGES。使用来自UKB的eBMD GWAS数据作为

结果数据集进行了两样本孟德尔随机化分析)。使用两种不同算法进行的共定位分析进一步支持了这种关系 (Coloc和eCAVIAR;H3的Coloc后验概率=0.042,H4的Coloc后验概率=0.958;eCAVIAR CLPP C1=0.024,CLPP C2=0.002)。这些结果为表2中报告的结果提供了补充证据,所述结果表明CD109的功能丧失与较高的eBMD相关。CD109中的几个罕见pLoF和错义突变显示与UKB中eBMD相关的名义上的证据 (关联的P值<0.05;表4)。

[0175] 表4:孟德尔随机化分析支持循环CD109浓度对eBMD的因果影响

[0176]	pQTL 来源	pQTL	对 eBMD 的影响, 以 SD 单位计, 每 SD 单位循环 CD109 浓度降低	P 值
	INTERVAL	rs6903575	0.056 (SE=0.004)	6.4×10^{-37}
	AGES	rs6909201	0.043 (SE=0.003)	3.2×10^{-09}

[0177] pQTL, 蛋白质数量性状基因座;SD, 标准偏差;SE, 标准误差。

[0178] 实施例3:适用于CD109处的常见遗传变异的机器学习算法鉴定了暗示CD109是介导与eBMD关联的因果基因的进一步证据

[0179] 将机器学习算法(效应指数)应用于eBMD全基因组关联数据,并且观察到强有力的证据表明CD109是介导此基因组区域中的eBMD GWAS关联的因果基因(效应指数=0.96,这指示CD109是此基因座的因果基因的可能性很高)。