



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117957332 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 30

(21) 申请号 202280059731.6

(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

(22) 申请日 2022.09.27

专利代理师 黄鑫

(30) 优先权数据

63/250,546 2021.09.30 US

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6883 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.03.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/077088 2022.09.27

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/056254 EN 2023.04.06

(71) 申请人 雷杰纳荣制药公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 C·波尔丁 陈珊

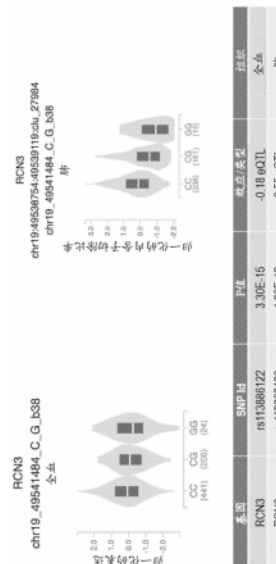
权利要求书5页 说明书18页
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

内质网钙结合蛋白-3 (RCN3) 变体和用白细胞介素-4受体 α (IL4R α) 拮抗剂治疗哮喘

(57) 摘要

本公开提供了鉴定具有发展出哮喘恶化的风险的受试者的方法以及治疗患有哮喘并且正在经历或将经历IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂治疗的受试者的方法。所述方法包括确定RCN3变体核酸、优选影响RCN3表达水平的内含子RCN3SNP rs113886122的存在步骤。



1. 一种降低患有哮喘的受试者的哮喘恶化率的方法,所述方法包括:
通过以下方式确定所述受试者是否具有内质网钙结合蛋白-3(RCN3)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RCN3变体核酸分子的基因型;以及向对于所述RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的受试者施用或已经施用IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂,从而降低所述受试者的哮喘恶化率。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述受试者对于所述RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的,并且向所述受试者施用同于或高于标准剂量量的量的所述IL4R α 拮抗剂和/或所述IL13阻断剂,和/或RCN3激动剂。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述RCN3变体核酸分子是具有包含以下的核苷酸序列的基因组核酸分子:在对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述确定步骤在体外进行。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括对所述生物样品中的所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中所述测序的部分包含对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置;其中当所述生物样品中的所述RCN3基因组核酸分子的所述测序的部分包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤时,则所述生物样品中的所述RCN3基因组核酸分子是RCN3变体基因组核酸分子。
6. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括:
 - a) 使所述生物样品与引物接触,所述引物与所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列的一部分杂交,所述部分接近对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置;
 - b) 将所述引物延伸至少通过所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列的对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置;以及
 - c) 确定所述引物的所述延伸产物是否包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤。
7. 根据权利要求5或权利要求6所述的方法,其中所述确定步骤包括对整个核酸分子进行测序。
8. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括:
 - a) 对所述生物样品中的所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的至少一部分进行扩增,其中所述部分包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤;
 - b) 用可检测标记来标记所述扩增的核酸分子;
 - c) 使所述标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所述扩增的核酸分子的核苷酸序列杂交的核苷酸序列,所述扩增的核酸分子的核苷酸序列包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤;以及
 - d) 检测所述可检测标记。

9. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括:

使所述生物样品中的所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列杂交的核苷酸序列,所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤;以及

检测所述可检测标记。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述核酸分子存在于从所述受试者获得的细胞内。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述IL4R α 拮抗剂和/或所述IL13阻断剂是杜匹单抗。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述RCN3激动剂是RCN3蛋白。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,所述方法还包括向所述受试者施用或继续施用治疗或抑制哮喘恶化的治疗剂。

14. 一种治疗患有哮喘并且正在经历或将经历IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂治疗的受试者的方法,所述方法包括:

通过以下方式确定所述受试者是否具有内质网钙结合蛋白-3(RCN3)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RCN3变体核酸分子的基因型;以及向作为RCN3参考的受试者施用或继续施用标准剂量量的所述IL4R α 拮抗剂和/或所述IL13阻断剂;以及

向对于所述RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的受试者施用或继续施用同于或高于标准剂量量的量的所述IL4R α 拮抗剂和/或所述IL13阻断剂,和/或RCN3激动剂;

其中受试者中对于所述RCN3变体核酸分子是纯合的基因型的存在指示所述受试者与具有对于所述RCN3变体核酸分子是杂合的基因型的受试者相比具有增加的哮喘恶化的风险,并且对于所述RCN3变体核酸分子是杂合的基因型的存在指示所述受试者与具有作为RCN3参考的基因型的受试者相比具有增加的哮喘恶化的风险。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述受试者是RCN3参考,并且向所述受试者施用或继续施用标准剂量量的所述IL4R α 拮抗剂和/或所述IL13阻断剂。

16. 根据权利要求14所述的方法,其中所述受试者对于所述RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的,并且向所述受试者施用或继续施用高于标准剂量量的量的所述IL4R α 拮抗剂和/或所述IL13阻断剂。

17. 根据权利要求14所述的方法,其中所述受试者对于所述RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的,并且向所述受试者施用或继续施用同于或高于标准剂量量的量的所述IL4R α 拮抗剂和/或所述IL13阻断剂,和/或RCN3激动剂。

18. 根据权利要求14至17中任一项所述的方法,其中所述RCN3变体核酸分子是具有包含以下的核苷酸序列的基因组核酸分子:在对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤。

19. 根据权利要求14至18中任一项所述的方法,其中所述确定步骤在体外进行。

20. 根据权利要求14至19中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括对所述生物样品中的所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中所述测序的部分包含对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置;其中当所述生物样品中的所述RCN3基因组核酸分子的所述测序的部分包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤时,则所述生物样品中的所述RCN3基因组核酸分子是RCN3变体基因组核酸分子。

21. 根据权利要求14至19中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括:

a) 使所述生物样品与引物接触,所述引物与所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列的一部分杂交,所述部分接近对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置;

b) 将所述引物延伸至少通过所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列的对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置;以及

c) 确定所述引物的所述延伸产物是否包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤。

22. 根据权利要求20或权利要求21所述的方法,其中所述确定步骤包括对整个核酸分子进行测序。

23. 根据权利要求14至19中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括:

a) 对所述生物样品中的所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的至少一部分进行扩增,其中所述部分包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤;

b) 用可检测标记来标记所述扩增的核酸分子;

c) 使所述标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所述扩增的核酸分子的核苷酸序列杂交的核苷酸序列,所述扩增的核酸分子的核苷酸序列包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤;以及

d) 检测所述可检测标记。

24. 根据权利要求14至19中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括:

使所述生物样品中的所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列杂交的核苷酸序列,所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤;以及

检测所述可检测标记。

25. 根据权利要求14至24中任一项所述的方法,其中所述核酸分子存在于从所述受试者获得的细胞内。

26. 根据权利要求14至25中任一项所述的方法,其中所述IL4R α 拮抗剂和/或所述IL13阻断剂是杜匹单抗。

27. 根据权利要求14至26中任一项所述的方法,其中所述RCN3激动剂是RCN3蛋白。

28. 根据权利要求14至27中任一项所述的方法,所述方法还包括向所述受试者施用或

继续施用治疗或抑制哮喘恶化的治疗剂。

29. 一种鉴定具有发展出哮喘恶化的风险的受试者的方法,所述方法包括:

确定或已经确定从所述受试者获得的生物样品中存在或不存在内质网钙结合蛋白-3 (RCN3) 变体核酸分子;

其中当所述受试者对于所述RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的时,所述受试者与作为RCN3参考的受试者相比具有增加的发展出哮喘恶化的风险。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述RCN3变体核酸分子是具有包含以下的核苷酸序列的基因组核酸分子:在对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤。

31. 根据权利要求29或权利要求30所述的方法,其中所述确定步骤在体外进行。

32. 根据权利要求29至31中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括对所述生物样品中的所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中所述测序的部分包含对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置;其中当所述生物样品中的所述RCN3基因组核酸分子的所述测序的部分包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤时,则所述生物样品中的所述RCN3基因组核酸分子是RCN3变体基因组核酸分子。

33. 根据权利要求29至32中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括:

a) 使所述生物样品与引物接触,所述引物与所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列的一部分杂交,所述部分接近对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置;

b) 将所述引物延伸至少通过所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列的对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置;以及

c) 确定所述引物的所述延伸产物是否包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤。

34. 根据权利要求32或权利要求33所述的方法,其中所述确定步骤包括对整个核酸分子进行测序。

35. 根据权利要求29至31中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括:

a) 对所述生物样品中的所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的至少一部分进行扩增,其中所述部分包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤;

b) 用可检测标记来标记所述扩增的核酸分子;

c) 使所述标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所述扩增的核酸分子的核苷酸序列杂交的核苷酸序列,所述扩增的核酸分子的核苷酸序列包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤;以及

d) 检测所述可检测标记。

36. 根据权利要求29至31中任一项所述的方法,其中所述确定步骤包括:

使所述生物样品中的所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中所述改变特异性探针包含在严格条件下与所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列杂交的核苷酸序列,所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列

的核苷酸序列包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤;以及

检测所述可检测标记。

37. 根据权利要求29至36中任一项所述的方法,其中所述受试者是RCN3参考,并且所述方法还包括以标准剂量量向所述受试者施用或向所述受试者继续施用所述IL4R α 拮抗剂和/或所述IL13阻断剂。

38. 根据权利要求29至36中任一项所述的方法,其中所述受试者对于所述RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的,并且所述方法还包括向所述受试者施用或向所述受试者继续施用:

高于标准剂量量的量的所述IL4R α 拮抗剂和/或所述IL13阻断剂;或

标准剂量量的或高于标准剂量量的量的所述IL4R α 拮抗剂和/或所述IL13阻断剂,和/或RCN3激动剂。

39. 根据权利要求37或权利要求38所述的方法,其中所述IL4R α 拮抗剂和/或所述IL13阻断剂是杜匹单抗。

40. 根据权利要求38所述的方法,其中所述IL4R α 拮抗剂和/或所述IL13阻断剂是杜匹单抗并且所述RCN3激动剂是RCN3蛋白。

41. 根据权利要求37至40中任一项所述的方法,所述方法还包括向所述受试者施用或向所述受试者继续施用治疗或抑制哮喘恶化的治疗剂。

42. 一种治疗患有哮喘或处于发展出哮喘的风险中并且正在经历或将经历IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂治疗的受试者的方法,所述方法包括:

确定或已经确定所述受试者的RCN3基因表达评分(RGES),其中所述RGES包括由来自所述受试者的样品中的基因表达确定的值,并且

当所述受试者的RGES大于由无哮喘受试者的参考群体确定的阈值RGES时,向所述受试者施用或继续施用同于或高于标准剂量量的量的所述IL4R α 拮抗剂和/或所述IL13阻断剂,和/或RCN3激动剂。

43. 一种同于或高于标准剂量量的量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂,和/或RCN3激动剂,用于治疗具有发展出哮喘恶化的风险的受试者的哮喘,其中所述受试者被鉴定为具有RCN3变体基因组核酸分子或其互补序列,其中所述RCN3变体基因组核酸分子具有包含以下的核苷酸序列:在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述IL4R α 拮抗剂和/或所述IL13阻断剂是杜匹单抗。

45. 根据权利要求43或权利要求44所述的方法,其中所述RCN3激动剂是RCN3蛋白。

内质网钙结合蛋白-3 (RCN3) 变体和用白细胞介素-4受体 α (IL4R) 拮抗剂治疗哮喘

[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381203564SEQ,创建于2022年9月23日,大小为46千字节。所述序列表以引用的方式并入本文。

技术领域

[0003] 本公开总体上涉及降低患有哮喘的受试者的哮喘恶化率的方法以及治疗患有哮喘并且正在经历或将经历IL4R α 拮抗剂治疗的受试者的方法。

背景技术

[0004] 哮喘是一种肺部气道炎性疾病。所述病状的特点是症状多变且反复出现、可逆性气流阻塞以及容易引发支气管痉挛。哮喘的诊断可能涉及肺活量测定肺功能测试,包括测定一秒用力呼气容积 (FEV1) 和峰值呼气流速,以及评估年化恶化率。哮喘的治疗包括施用快速起效或长期有效的药物。沙丁胺醇是快速起效药物的主体,而吸入皮质类固醇多年来一直是长期治疗的主体。最近,诸如美泊利单抗 (mepolizumab)、杜匹单抗 (dupilumab) 和奥马珠单抗 (omalizumab) 的抗体已被用于治疗特定类型的哮喘。DUPIXENT[®],其包含杜匹单抗,目前已被批准用于12岁及以上的受试者。

[0005] 内质网钙结合蛋白-3或EF手钙结合蛋白RPL49 (“RCN3”) 是一种定位于分泌途径的内质网腔蛋白。小鼠RCN3基因的敲除对于新生儿来说是致命的,并且与肺不张引起的新生儿呼吸窘迫、II型肺泡上皮细胞 (AECII) 成熟失败以及表面活性蛋白A和D的急剧减少相关。肺不张是一种整个肺或肺区域 (肺叶) 完全或部分塌陷。当肺内的微小气囊 (肺泡) 萎泄或可能充满肺泡液时,就会发生肺不张。肺不张是手术后最常见的呼吸 (呼吸系统) 并发症之一。减少RCN3表达的体外研究结果是表面活性蛋白分泌减弱 (参见Jin等人, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2016, 54, 410-23)。另外,成年小鼠AECII中RCN3的选择性缺失会导致暴露于博莱霉素后肺纤维化加剧和肺力学降低 (参见Jin等人, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2018, 59, 320-333)。

发明内容

[0006] 本公开提供了降低患有哮喘的受试者的哮喘恶化率的方法,所述方法包括:通过以下方式确定受试者是否具有内质网钙结合蛋白-3 (RCN3) 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RCN3变体核酸分子的基因型;以及向对于RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的受试者施用或已经施用IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂,从而降低受试者的哮喘恶化率。

[0007] 本公开还提供了治疗患有哮喘并且正在经历或将经历IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂治疗的受试者的方法,所述方法包括:通过以下方式确定受试者是否具有内质网钙结合蛋白-3 (RCN3) 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RCN3变体核酸分子的基因型;以及向作为RCN3参考的受试者施用或继续施用标准剂量量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂;以及向对于RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的受试者施用或继续施用同于或高于标准剂量量的量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂,和/或RCN3激动剂;其中受试者中对于RCN3变体核酸分子是纯合的基因型的存在指示受试者与具有对于RCN3变体核酸分子是杂合的基因型的受试者相比具有增加的哮喘恶化的风险,并且对于RCN3变体核酸分子是杂合的基因型的存在指示受试者与具有作为RCN3参考的基因型的受试者相比具有增加的哮喘恶化的风险。

[0008] 本公开还提供了鉴定具有发展出哮喘恶化的风险的受试者的方法,所述方法包括:确定或已经确定从受试者获得的生物样品中存在或不存在内质网钙结合蛋白-3(RCN3)变体核酸分子;其中当受试者对于RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的时,受试者与作为RCN3参考的受试者相比具有增加的发展出哮喘恶化的风险。

[0009] 本公开还提供了治疗患有哮喘或处于发展出哮喘的风险中并且正在经历或将经历IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂治疗的受试者的方法,所述方法包括:确定或已经确定受试者的RCN3基因表达评分(RGES),其中RGES包括由来自受试者的样品中的基因表达确定的值,并且当受试者的RGES大于由无哮喘受试者的参考群体确定的阈值RGES时,向受试者施用或继续施用同于或高于标准剂量量的量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂,和/或RCN3激动剂。

[0010] 本公开还提供了同于或高于标准剂量量的量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂,和/或RCN3激动剂,用于治疗具有发展出哮喘恶化的风险的受试者的哮喘,其中受试者被鉴定为具有RCN3变体基因组核酸分子或其互补序列,其中RCN3变体基因组核酸分子具有包含以下的核苷酸序列:在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤。

附图说明

[0011] 并入本说明书中并构成其一部分的附图展示本公开的若干特征。

[0012] 专利或申请文件含有至少一张彩色附图。在提出请求并支付必要费用后,本事务所将提供具有一张或多张彩色附图的本专利或专利申请公布的副本。

[0013] 图1示出了在考虑表达数量性状基因座(eQTL)和剪接数量性状基因座(sQTL)时,19:49541484:C:G(rs113886122)与基因型-组织表达(GTEX)中RCN3表达减少的关联。

[0014] 图2示出了仅在杜匹单抗治疗的受试者中19:49541484:C:G(rs113886122)与恶化的显著关联。

[0015] 图3示出了在杜匹单抗治疗的哮喘受试者中19:49541484:C:G(rs113886122)与年化恶化率增加的关联。

[0016] 图4示出了在杜匹单抗治疗的受试者中19:49541484:C:G(rs113886122)与恶化增加以及基线肺功能降低的关联。

具体实施方式

[0017] 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。

[0018] 除非另外明确说明,否则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特别地说明步骤是限于特定顺序时,在任何方面并非意图推断顺序。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。

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 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”。

[0022] 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/或其他组织。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。

[0023] 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,且可以是单链的、双链的或多链的。核酸的一条链还是指其互补序列。

[0024] 如本文所用,术语“受试者”包括任何动物,包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于农场动物(诸如例如,马、牛、猪)、伴侣动物(诸如例如,狗、猫)、实验室动物(诸如例如,小鼠、大鼠、兔)和非人灵长类动物(诸如例如,猿和猴)。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者是在医生护理下的患者。

[0025] 根据本公开已经鉴定了与人发展出哮喘恶化的风险相关的RCN3基因中的常见变体。例如,已观察到将RCN3参考基因组核酸分子(参见SEQ ID NO:1)中的位置13,482处的胞嘧啶改变为鸟嘌呤的遗传改变,表明具有此类改变的受试者可能具有发展出哮喘恶化的风险。在本公开之前,据信RCN3基因或RCN3蛋白的变体与哮喘年化恶化率增加没有任何关联。总而言之,本文所述的遗传分析令人惊讶地表明RCN3基因,并且特别是RCN3基因的变体与发展出哮喘恶化的风险相关。因此,可治疗具有发展出哮喘恶化的风险的、具有RCN3变体核酸分子的受试者,从而降低哮喘恶化率、减轻其症状和/或抑制症状的发展。因此,本公开提供了利用受试者中此类变体的鉴定来进行以下操作的方法:对此类受试者发展出哮喘年化恶化率增加的风险进行鉴定或分层,或将受试者诊断为具有发展出哮喘恶化的风险,使得处于风险中的受试者或患有活动性疾病的受试者可得到相应的治疗。

[0026] 出于本公开的目的,任何特定的受试者都可归类为具有以下三种RCN3基因型之一:i)RCN3参考;ii)对于RCN3变体核酸分子是杂合的;或iii)对于RCN3变体核酸分子是纯合的。当受试者不具有RCN3变体核酸分子的拷贝时,所述受试者是RCN3参考。作为非限制性

实例,列示于SEQ ID NO:1中的核苷酸序列是RCN3参考序列,因为位置13,482处的核苷酸包含胞嘧啶而不是鸟嘌呤。当受试者具有RCN3变体核酸分子的单个拷贝时,所述受试者对于RCN3变体核酸分子是杂合的。不限于任何特定理论,据信RCN3变体核酸分子的存在最终导致观察到的年化恶化率增加。因此,如本文所用,RCN3变体核酸分子是与在RCN3参考受试者中观察到的相比导致RCN3mRNA、非编码RNA和/或蛋白质的表达改变(或降低)的任何RCN3核酸分子(诸如基因组核酸分子、mRNA分子、非编码RNA或cDNA分子)。作为非限制性实例,列示于SEQ ID NO:2中的核苷酸序列是RCN3变体核酸,因为位置13,482处的核苷酸包含鸟嘌呤而不是胞嘧啶(即,rs113886122)。当受试者具有RCN3变体核酸分子的两个拷贝时,所述受试者对于RCN3变体核酸分子是纯合的。

[0027] 对于基因分型或确定为对于RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的受试者,此类受试者具有发展出哮喘恶化的风险。对于基因分型或确定为对于RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的受试者,此类受试者可用同于或高于标准剂量量的量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂治疗。另外,对于基因分型或确定为对于RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的受试者,此类受试者可用同于或高于标准剂量量的量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂,和/或用RCN3激动剂治疗。在一些实施方案中,还可用治疗或抑制哮喘恶化的治疗剂来治疗受试者。

[0028] 在本公开通篇描述的任何实施方案中,RCN3变体核酸分子可以是本文所述的任何RCN3变体核酸分子。

[0029] 在本文所述的任何实施方案中,恶化可被认为是需要急诊室(ED)/医院入院或口服皮质类固醇(OCS)治疗的哮喘加重。在一些实施方案中,“严重恶化(exacerbation)事件”被定义为由于哮喘需要全身性皮质类固醇而需要使用全身性皮质类固醇 ≥ 3 天和/或需要住院或急诊室就诊的哮喘恶化(deterioration)。

[0030] 本公开提供了降低患有哮喘的受试者的哮喘恶化率的方法。在一些实施方案中,所述方法包括确定受试者是否具有内质网钙结合蛋白-3(RCN3)变体核酸分子。此确定可通过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RCN3变体核酸分子的基因型来进行。当受试者对于RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的时,向受试者施用IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂,从而降低受试者的哮喘恶化率。

[0031] 本公开还提供了治疗患有哮喘并且正在经历或将经历IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂治疗的受试者的方法。在一些实施方案中,受试者正在经历IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂治疗。在一些实施方案中,受试者尚未但将经历IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂治疗。在一些实施方案中,所述方法包括确定受试者是否具有RCN3变体核酸分子。此确定可通过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RCN3变体核酸分子的基因型来进行。当受试者是RCN3参考时,施用或继续施用标准剂量量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂。当受试者对于RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的时,施用或继续施用同于或高于标准剂量量的量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂,和/或施用或继续施用RCN3激动剂。具有RCN3变体核酸分子的基因型的存在指示受试者具有增加的发展出哮喘恶化的风险。受试者中对于RCN3变体核酸分子是纯合的基因型的存在指示受试者与具有对于RCN3变体核酸分子是杂合的基因型的受试者相比具有增加的哮喘恶化的风险。对于RCN3变体核酸分子是杂合的基因型的存在指示受试者与具有作为RCN3

参考的基因型的受试者相比具有增加的哮喘恶化的风险。

[0032] 本公开还提供了用IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂治疗患有哮喘的受试者的方法,其中所述受试者对于RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的。可向受试者施用同于或高于标准剂量量的量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂,并且还可施用RCN3激动剂。

[0033] 在本文所述的任何实施方案中,治疗方法还可进一步包括向受试者施用或继续施用治疗或抑制哮喘恶化的治疗剂。

[0034] 在本文所述的任何实施方案中,RCN3变体核酸分子是具有包含以下的核苷酸序列的基因组核酸分子:在对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤(或胸腺嘧啶)。在一些实施方案中,RCN3变体核酸分子是具有包含以下的核苷酸序列的基因组核酸分子:在对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤。本文公开的变体核酸分子还可包括靠近RCN3基因(例如,基因周围至多10Mb)或与RCN3基因连锁不平衡的任何遗传变体,无论其基因组注释如何,所述变体在遗传关联分析中显示出与哮喘的非零关联。

[0035] 在本文所述的任何实施方案中,哮喘可以是儿童哮喘、过敏性哮喘、非过敏性哮喘、运动诱发的哮喘、职业性哮喘、成人发病的哮喘或夜间哮喘。在一些实施方案中,哮喘是儿童哮喘。在一些实施方案中,哮喘是过敏性哮喘。在一些实施方案中,哮喘是非过敏性哮喘。在一些实施方案中,哮喘是运动诱发的哮喘。在一些实施方案中,哮喘是职业性哮喘。在一些实施方案中,哮喘是成人发病的哮喘。在一些实施方案中,哮喘是夜间哮喘。

[0036] 在一些实施方案中,受试者是成人。在一些实施方案中,受试者是2岁以下的婴儿。在一些实施方案中,受试者是早产婴儿。对于RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的婴儿可进一步用表面活性剂治疗。在一些实施方案中,受试者年龄为约6岁至约12岁。在一些实施方案中,受试者年满12岁。

[0037] 在一些实施方案中,受试者是RCN3参考。在一些实施方案中,受试者对于RCN3变体核酸分子是杂合的。在一些实施方案中,受试者对于RCN3变体核酸分子是纯合的。

[0038] 在一些实施方案中,受试者是RCN3参考,并且向受试者施用或继续施用标准剂量量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂。在一些实施方案中,受试者对于RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的,并且向受试者施用或继续施用同于或高于标准剂量量的量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂。在一些实施方案中,受试者对于RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的,并且向受试者施用或继续施用同于或高于标准剂量量的量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂,和/或RCN3激动剂。

[0039] 检测从受试者获得的生物样品中存在或不存在RCN3变体核酸分子和/或确定受试者是否具有RCN3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,RCN3变体核酸分子可存在于从受试者获得的细胞内。

[0040] IL4R α 拮抗剂包括但不限于杜匹单抗和皮崔金拉(pitrakinra)。IL13阻断剂包括但不限于杜匹单抗、曲罗芦单抗(tralokinumab)、皮崔金拉和来瑞组单抗(lebrikizumab)。成人和青少年(12岁及以上)的杜匹单抗的标准剂量量为:i) 初始剂量400mg(两次200mg注射),随后每隔一周施用200mg;ii) 初始剂量600mg(两次300mg注射),随后每隔一周施用300mg;或iii) 对于需要同步口服皮质类固醇或患有合并症的中度至重度特应性皮炎且杜

匹单抗适用的患者,以初始剂量600mg开始,随后每隔一周施用300mg。在一些实施方案中,IL4R α 拮抗剂不是IL13阻断剂。在一些实施方案中,IL13阻断剂不是IL4R α 拮抗剂。在一些实施方案中,IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂是单独的拮抗剂。当IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂是单独的拮抗剂时,第一单独的拮抗剂是IL4R α 拮抗剂但不是IL13阻断剂并且第二单独的拮抗剂是IL13阻断剂但不是IL4R α 拮抗剂,即,施用两种单独的拮抗剂。

[0041] 在一些实施方案中,IL4R α 拮抗剂特异性结合人IL-4R α 并且包含有包含SEQ ID NO:3的重链可变区(HCVR)和包含SEQ ID NO:4的轻链可变区(LCVR)、包含SEQ ID NO:5的重链互补决定区1(HCDR1)、包含SEQ ID NO:6的HCDR2、包含SEQ ID NO:7的HCDR3、包含SEQ ID NO:8的轻链互补决定区1(LCDR1)、包含SEQ ID NO:9的LCDR2和包含SEQ ID NO:10的LCDR3。杜匹单抗的全长重链示出为SEQ ID NO:311,并且全长轻链示出为SEQ ID NO:12。人抗IL-4R抗体可如美国专利号7,608,693中所述产生。

[0042] 示例性RCN3激动剂是RCN3蛋白。

[0043] 治疗或抑制急性哮喘恶化的治疗剂的实例包括但不限于单独或与长效 β 2-激动剂(LABA)组合的吸入皮质类固醇(ICS)、口服皮质类固醇、杜匹单抗、美泊利珠单抗、贝那利珠单抗(benralizumab)、瑞利珠单抗(reslizumab)、奥马珠单抗、特泽鲁单抗(tezepelumab)和阿奇霉素。在一些实施方案中,可施用增加剂量的ICS。

[0044] 在一些实施方案中,与作为RCN3参考的受试者(其可接受标准剂量量)相比,对于对RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的受试者,IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂的剂量可增加约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%或约90%(即,高于标准剂量量)。在一些实施方案中,IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂的剂量可增加约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。另外,与作为RCN3参考的受试者相比,对于RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的受试者,IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂的剂量可更频繁地施用。

[0045] IL4R α 拮抗剂、IL13阻断剂、RCN3激动剂,和/或治疗或抑制哮喘恶化的治疗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。

[0046] IL4R α 拮抗剂、IL13阻断剂、RCN3激动剂,和/或治疗或抑制哮喘恶化的治疗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。

[0047] 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:年化恶化率增加的降低/减轻,年化恶化率增加的严重程度的降低/减轻(诸如例如减轻或抑制年化恶化率增加的发展),症状和年化恶化率

增加相关效应的降低/减轻,延迟症状和年化恶化率增加相关效应的发作,减轻年化恶化率增加相关效应的症状的严重程度,减轻急性发作的严重程度,减少症状和年化恶化率增加相关效应的数目,减少症状和年化恶化率增加相关效应的潜伏期,症状和年化恶化率增加相关效应的改善,减少继发性症状,预防年化恶化率增加复发,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,加快缓解,诱导缓解,加强缓解,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/抑制或延迟年化恶化率增加发展/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。年化恶化率增加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恶化的受试者,延迟恶化的症状或体征的发作或演变或加重或恶化,和/或预防和/或减轻恶化的严重程度。

[0048] 本公开还提供了治疗患有哮喘或处于发展出哮喘的风险中并且正在经历或将经历IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂治疗的受试者的方法,所述方法包括:确定或已经确定受试者RCN3基因表达评分(RGES),其中RGES包括由来自受试者的样品中的基因表达确定的值,并且当受试者RGES大于由无哮喘受试者的参考群体确定的阈值RGES时,向受试者施用或继续施用同于或高于标准剂量量的量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂,和/或RCN3激动剂。

[0049] 本公开还提供了鉴定具有发展出哮喘恶化的风险的受试者的方法。在一些实施方案中,所述方法包括确定或已经确定从受试者获得的生物样品中存在或不存在的RCN3变体核酸分子。当受试者缺乏RCN3变体核酸分子(即,受试者在基因型上分类为RCN3参考)时,受试者不具有增加的发展出哮喘恶化的风险。当受试者具有RCN3变体核酸分子(即,受试者对于RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的)时,受试者具有增加的发展出哮喘恶化的风险。

[0050] 据信,与作为RCN3参考的受试者相比,RCN3变体核酸分子的单个拷贝(即对于RCN3变体核酸分子是杂合的)使受试者具有更大的发展出哮喘恶化的风险。与具有RCN3变体核酸分子的单个拷贝相比,具有RCN3变体核酸分子的两个拷贝(即,对于RCN3变体核酸分子是纯合的)可使受试者具有更大的发展出哮喘恶化的风险。

[0051] 在一些实施方案中,RCN3变体核酸分子是具有包含以下的核苷酸序列的基因组核酸分子:在对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤。在一些实施方案中,RCN3变体核酸分子是具有包含以下的核苷酸序列的基因组核酸分子:在对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤。

[0052] 检测从受试者获得的生物样品中存在或不存在的RCN3变体核酸分子和/或确定受试者是否具有RCN3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,RCN3变体核酸分子可存在于从受试者获得的细胞内。

[0053] 在一些实施方案中,当受试者是RCN3参考时,所述方法还可包括向受试者施用或继续施用标准剂量量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂。在一些实施方案中,当受试者对于RCN3变体核酸分子是杂合的或纯合的时,所述方法还可包括向受试者施用或向受试者继续施用标准剂量量的或高于标准剂量量的量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂,和/或RCN3激

动剂。在一些实施方案中,所述方法还可进一步包括向受试者施用或继续施用治疗或抑制哮喘恶化的治疗剂。

[0054] 在一些实施方案中,IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂是杜匹单抗。在一些实施方案中,RCN3激动剂是RCN3蛋白。

[0055] 在一些实施方案中,受试者是RCN3参考。在一些实施方案中,受试者对于RCN3变体核酸分子是杂合的。在一些实施方案中,受试者对于RCN3错义变体核酸分子是纯合的。

[0056] 在一些实施方案中,针对风险进行检查的受试者是成人。在一些实施方案中,针对风险进行检查的受试者是2岁以下的婴儿。在一些实施方案中,针对风险进行检查的受试者是早产婴儿。

[0057] 本公开还提供了检测从受试者获得的生物样品中存在或不存在RCN3变体核酸分子的方法。应理解,群体内的基因序列和由此类基因编码的RNA分子(无论是mRNA还是非编码RNA)可因多态性诸如单核苷酸多态性(SNP)而变化。本文提供的RCN3变体核酸分子的序列仅是示例性序列。RCN3变体核酸分子的其他序列也是可能的。

[0058] 生物样品可来源于来自受试者的任何细胞、组织或生物流体。生物样品可包括任何临床相关组织,诸如例如骨髓样品、肿瘤活检、细针抽吸物或体液样品,诸如血液、龈沟液、血浆、血清、淋巴、腹水、囊液或尿液。在一些实施方案中,生物样品包括口腔拭子。本文所公开的方法中使用的生物样品可基于测定形式、检测方法的性质以及用作样品的组织、细胞或提取物而变化。生物样品可根据所采用的测定进行不同处理。例如,当检测任何RCN3变体核酸分子时,可采用被设计用于分离RCN3变体核酸分子或使生物样品富集所述分子的初步处理。多种技术可用于此目的。

[0059] 本公开还提供了检测受试者中的RCN3变体核酸分子或其互补序列的方法。所述方法包括对从受试者获得的生物样品进行测定以确定生物样品中的核酸分子是否是RCN3变体核酸分子。在一些实施方案中,RCN3变体核酸分子或其互补序列是具有包含以下的核苷酸序列的基因组核酸分子:在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤。在一些实施方案中,RCN3变体基因组核酸分子具有包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤的核苷酸序列。

[0060] 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RCN3基因组核酸分子的生物样品。此类测定可包括,例如确定特定RCN3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。

[0061] 在一些实施方案中,测定包括对生物样品中的RCN3核酸分子或其互补序列的核苷酸序列的至少一部分进行测序。在一些实施方案中,所述测定包括对生物样品中的RCN3基因组核酸分子的核苷酸序列的至少一部分进行测序,其中测序的部分包含对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置。

[0062] 在一些实施方案中,所述测定包括对生物样品中的RCN3基因组核酸分子或其互补序列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对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置。当生物样品中的RCN3基因组核酸分子的测序的部分包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤时,则生物样品中的RCN3基因组核酸分子是RCN3变体基因组核酸分子。

[0063] 在一些实施方案中,所述测定包括:a)使生物样品与引物接触,所述引物与RCN3基

基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列的一部分杂交,所述部分接近对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置;b)将所述引物延伸至少通过RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列的对应于以下的位置:根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482;以及c)确定所述引物的所述延伸产物是否包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤。

[0064] 在一些实施方案中,所述测定包括:a)使生物样品与引物接触,所述引物与RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列的一部分杂交,所述部分接近对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置;b)将所述引物延伸至少通过RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列的对应于以下的位置:根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482;以及c)确定所述引物的所述延伸产物是否包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤。

[0065] 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RCN3基因组核酸分子。

[0066] 在一些实施方案中,所述测定包括:a)对生物样品中的RCN3核酸分子或其互补序列的至少一部分进行扩增,其中扩增的部分包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤;b)用可检测标记来标记扩增的核酸分子;c)将标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中改变特异性探针包含在严格条件下与扩增的核酸分子的核苷酸序列杂交的核苷酸序列,所述扩增的核酸分子的核苷酸序列包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤;以及d)检测可检测标记。

[0067] 在一些实施方案中,所述测定包括:a)对生物样品中的RCN3基因组核酸分子或其互补序列的至少一部分进行扩增,其中所述部分包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤;b)用可检测标记来标记扩增的核酸分子;c)将标记的核酸分子与包含改变特异性探针的支持物接触,其中改变特异性探针包含在严格条件下与扩增的核酸分子的核苷酸序列杂交的核苷酸序列,所述扩增的核酸分子的核苷酸序列包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤;以及d)检测可检测标记。

[0068] 在一些实施方案中,所述测定包括:使生物样品中的RCN3核酸分子或其互补序列与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中改变特异性探针包含在严格条件下与RCN3核酸分子或其互补序列的核苷酸序列杂交的核苷酸序列,所述RCN3核酸分子或其互补序列的核苷酸序列包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤;以及检测可检测标记。

[0069] 在一些实施方案中,所述测定包括:使生物样品中的RCN3基因组核酸分子或其互补序列与包含可检测标记的改变特异性探针接触,其中改变特异性探针包含在严格条件下与RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列杂交的核苷酸序列,所述RCN3基因组核酸分子或其互补序列的核苷酸序列包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤;以及检测可检测标记。

[0070] 在一些实施方案中,RCN3核酸分子存在于从受试者获得的细胞内。

[0071] 改变特异性聚合酶链反应技术可用于检测核苷酸序列中的突变,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。

[0072] 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RCN3基因组核酸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连续核苷酸的完全核苷酸序列同一性,但可通过常规方法设计不同于靶核苷酸序列并保留特异性检测和/或鉴定靶核苷酸序列的能力的探针。探针和引物可与靶核酸分子的核苷酸序列具有约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%序列同一性或互补性。

[0073] 在一些实施方案中,为了确定生物样品内的RCN3核酸分子(诸如基因组核酸分子)或其互补序列是否包含有包含在对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤的核苷酸序列,可使生物样品经受使用引物对的扩增方法以产生指示在编码对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤的位置处存在SNP的扩增子,所述引物对包含:第一引物,其衍生自与在对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤相邻的5'侧接序列;以及第二引物,其衍生自与在对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤相邻的3'侧接序列。在一些实施方案中,扩增子的长度范围可从引物对加上一个核苷酸碱基对的组合长度至可通过DNA扩增方案产生的扩增子的任何长度。此距离的范围可从一个核苷酸碱基对至扩增反应的极限,或约两万核苷酸碱基对。任选地,引物对侧接包括以下位置的区域,所述位置包含在对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤,以及包含在对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤的位置的每侧上的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多核苷酸。

[0074] PCR引物对可例如通过使用意图用于此目的的计算机程序衍生自己知的序列,所述计算机程序诸如Vector NTI版本10的PCR引物分析工具(Informax Inc.,Bethesda Md.);PrimerSelect(DNASTAR Inc.,Madison,Wis.);以及Primer3(版本0.4.0.COPYRGT.,1991,Whitehead Institute for Biomedical Research,Cambridge,Mass.)。另外,可视觉扫描序列并使用已知指南手动鉴定引物。

[0075] 核酸测序技术的说明性实例包括但不限于链终止子(Sanger)测序和染料终止子测序。其他方法涉及除了测序以外的核酸杂交方法,其包括使用针对纯化的DNA、扩增的DNA和固定细胞制品的标记的引物或探针(荧光原位杂交(FISH))。在一些方法中,可在检测之前或在检测的同时对靶核酸分子进行扩增。核酸扩增技术的例示性实例包括但不限于聚合酶链反应(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)。

[0076] 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。

[0077] 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)是已知的或可见于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。

[0078] 本公开还提供了与RCN3变体基因组核酸分子杂交的分离的核酸分子。在一些实施方案中,此类分离的核酸分子在严格条件下与RCN3变体核酸分子杂交。此类核酸分子可例如用作探针、引物、改变特异性探针或改变特异性引物,如本文所述或例示。

[0079] 在一些实施方案中,分离的核酸分子与RCN3基因组核酸分子的一部分杂交,所述部分包括对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置。

[0080] 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。

[0081] 在一些实施方案中,分离的改变特异性探针或改变特异性引物包含至少约15个核苷酸,其中改变特异性探针或改变特异性引物包含与RCN3基因组核酸分子或其互补序列的

一部分的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述部分包含对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置。

[0082] 在一些实施方案中,分离的核酸分子与同RCN3变体基因组核酸分子具有至少约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个连续核苷酸杂交。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。

[0083] 在一些实施方案中,分离的改变特异性探针或改变特异性引物包含至少约15个核苷酸,其中改变特异性探针或改变特异性引物包含与RCN3变体基因组核酸分子的核苷酸序列的一部分互补的核苷酸序列,其中所述部分包含对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置。

[0084] 在一些实施方案中,分离的改变特异性探针或改变特异性引物包含至少约15个核苷酸,其中改变特异性探针或改变特异性引物包含与RCN3核酸分子或其互补序列的一部分的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述部分包含对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置。

[0085] 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。

[0086] 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序列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任何核酸分子特异性地杂交。

[0087] 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酰化的引物,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中使用生物素酰化的引物。在检测步骤中使用荧光标记的简并九聚物寡核苷酸。衔接子可含有用于将DNA文库固定到链霉亲和素包被的珠粒上的5'-生物素标签。

[0088] 本文所述的探针和引物可用于检测RCN3变体基因组核酸分子内的核苷酸变异。本文所述的引物可用于对RCN3变体基因组核酸分子或其片段进行扩增。

[0089] 本公开还提供了包含上述引物中的任一种的引物对。例如,如果引物的3'-端之一与特定RCN3核酸分子中在对应于根据SEQ ID NO:1的位置13,482的位置处的胞嘧啶(而不是鸟嘌呤)杂交,则扩增片段的存在将指示RCN3参考基因组核酸分子的存在。相反地,如果引物的3'-端之一与特定RCN3核酸分子中在对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤(而不是胞嘧啶)杂交,则扩增片段的存在将指示RCN3变体基因组核酸分子的存在。在一些实施方案中,与在对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤互补的引物的核苷酸可在引物的3'端。

[0090] 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RCN3参考基因组核酸分子的核苷酸序列杂交。

[0091] 在本公开通篇描述的实施方案中的任一项中,探针(诸如例如,改变特异性探针)可包含标记。在一些实施方案中,所述标记是荧光标记、放射性标记或生物素。

[0092] 本公开还提供了包含本文所公开的探针中的任一种或多种所附接的基底的支持物。固体支持物是分子(诸如本文公开的探针中的任一种)可与其结合的固态基底或支持物。固体支持物的一种形式是阵列。固体支持物的另一种形式是阵列检测物。阵列检测物是多种不同的探针以阵列、网格或其他组织化模式与其偶联的固体支持物。固态基底的一种形式是微量滴定皿,诸如标准96孔类型。在一些实施方案中,可采用通常每孔含有一个阵列的多孔玻璃载片。在一些实施方案中,所述支持物是微阵列。

[0093] RCN3参考基因组核酸分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:1中。参考SEQ ID NO:1,位置13,482是胞嘧啶。

[0094] 存在RCN3变体基因组核酸分子,其中位置13,482处的胞嘧啶被鸟嘌呤替换。此RCN3变体基因组核酸分子的核苷酸序列列示于SEQ ID NO:2中。

[0095] 基因组核酸分子可来自任何生物体。例如,基因组核酸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。

[0096] 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。

[0097] 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。标记还可以是例如化学发光物质;含金属物质;或酶,其中发生酶依赖性二次信号生成。术语“标记”还可以指代“标签”或半抗原,其可以选择性地结合到缀合分子,使得当随后连同底物一起添加时,缀合分子用于生成可检测的信号。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。许多标记包括例如颗粒、荧光团、半抗原、酶及其量热、荧光和化学发光底物和其他标记。

[0098] 分离的核酸分子或其互补序列也可存在于宿主细胞内。在一些实施方案中,宿主细胞可包含载体,所述载体包含本文所述的任何核酸分子或其互补序列。在一些实施方案中,核酸分子可操作地连接至在宿主细胞中具有活性的启动子。在一些实施方案中,启动子

是外源启动子。在一些实施方案中,启动子是诱导型启动子。在一些实施方案中,宿主细胞是细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是细菌细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是酵母细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是昆虫细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞。

[0099] 所公开的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、糖或磷酸酯基团的核苷酸,或者在其结构中掺入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、生物素酰化的、胺化的、脱氨基的、烷基化的、苄化的和荧光团标记的核苷酸。

[0100] 本文公开的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、糖或磷酸酯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-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、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-硫代、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代(诸如例如5-溴)、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤、8-氮杂腺嘌呤、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。

[0101] 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、烯基和炔基可以是取代或未取代的C₁₋₁₀烷基或C₂₋₁₀烯基和C₂₋₁₀炔基。示例性的2'糖修饰还包括但不限于-O[(CH₂)_nO]_mCH₃、-O(CH₂)_nOCH₃、-O(CH₂)_nNH₂、-O(CH₂)_nCH₃、-O(CH₂)_n-ONH₂和-O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂,其中n和m独立地为1至约10。2'位置处的其他修饰包括但不限于C₁₋₁₀烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报告基团、嵌入剂、用于改善寡核苷酸的药代动力学特性的基团或用于改善寡核苷酸的药效动力学特性的基团,以及具有类似特性的其他取代基。还可在糖上的其他位置上做出类似的修饰,具体地在3'末端核苷酸上或在2'-5'连接的寡核苷酸中的糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。修饰的糖还可包括在桥环氧处含有修饰(诸如CH₂和S)的那些糖。核苷酸糖类似物还可具有替代呋喃戊糖的糖模拟物诸如环丁基部分。

[0102] 核苷酸类似物还可在磷酸酯部分处进行修饰。修饰的磷酸酯部分包括但不限于可被修饰以使得两个核苷酸之间的键联含有以下的修饰的磷酸酯部分:硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基磷酸酯(包括3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯)、次磷酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫羰氨基磷酸酯、硫羰烷基磷酸酯、硫羰烷基磷酸三酯和硼烷磷酸酯。两个核苷酸之间的这些磷酸酯或修饰的磷酸酯键联可通过3'-5'键联或2'-5'键联,并且所述键联可含有反转的极性,诸如3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'。还包括各种盐、混合盐以及游离酸

形式。核苷酸替代物还包括肽核酸(PNA)。

[0103] 本公开还提供包含本文公开的核酸分子中的任一者或多者的载体。在一些实施方案中,载体包含本文公开的任何一种或多种核酸分子和异源核酸。所述载体可为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)、Epstein-Barr(EBV)衍生的附加体以及本领域已知的其他表达载体。

[0104] 用于哺乳动物宿主细胞表达的所需调控序列可包括例如指导哺乳动物细胞中的高水平多肽表达的病毒元件,诸如衍生自逆转录病毒LTR、巨细胞病毒(CMV)(诸如例如CMV启动子/增强子)、猿猴病毒40(SV40)(诸如例如SV40启动子/增强子)、腺病毒(诸如例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))的启动子和/或增强子、多瘤病毒和哺乳动物强启动子(诸如天然免疫球蛋白和肌动蛋白启动子)。在细菌细胞或真菌细胞(诸如例如酵母细胞)中表达多肽的方法也是众所周知的。启动子可为例如组成型活性启动子、条件启动子、诱导型启动子、时间受限型启动子(诸如例如发育调控型启动子)或空间受限型启动子(诸如例如细胞特异性或组织特异性启动子)。

[0105] 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。

[0106] 本公开还提供包含本文公开的分离的核酸分子、基因组核酸分子、mRNA分子、非编码RNA分子和/或cDNA分子中的任一者或多者的组合物,或包含它们的载体。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。

[0107] 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。

[0108] 例如,包含有包含在对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤的核苷酸序列的RCN3核酸分子意指如果将RCN3基因组核酸分子的核苷酸序列与SEQ ID NO:2

的序列比对,则RCN3序列具有在对应于SEQ ID NO:2的位置13,482的位置处的鸟嘌呤残基。这些短语是指RCN3核酸分子,其中基因组核酸分子具有包含与SEQ ID NO:2的位置13,482处的鸟嘌呤残基同源的鸟嘌呤残基的核苷酸序列。

[0109] 如本文所述,例如,RCN3基因组核酸分子内对应于根据SEQ ID NO:2的位置13,482的位置可通过在特定RCN3核酸分子的核苷酸序列与SEQ ID NO:2的核苷酸序列之间进行序列比对来鉴定。存在多种可用于进行序列比对以鉴定对应于例如SEQ ID NO:2中的位置13,482的核苷酸位置的计算算法。例如,通过使用NCBI BLAST算法(Altschul等人,Nucleic Acids Res.,1997,25,3389-3402)或CLUSTALW软件(Sievers和Higgins,Methods Mol.Biol.,2014,1079,105-116)可进行序列比对。然而,序列也可手动地进行比对。

[0110] 所附序列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。

[0111] 本公开还提供了高于标准剂量量的量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂,和/或RCN3激动剂,用于治疗具有发展出哮喘恶化的风险的受试者的哮喘,其中受试者被鉴定为具有RCN3变体基因组核酸分子或其互补序列,其中RCN3变体基因组核酸分子具有包含以下的核苷酸序列:在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤。

[0112] 本公开还提供了高于标准剂量量的量的IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂,和/或RCN3激动剂或两者,用于制备用于治疗具有发展出哮喘恶化的风险的受试者的哮喘的药物,其中受试者被鉴定为具有RCN3变体基因组核酸分子或其互补序列,其中RCN3变体基因组核酸分子具有包含以下的核苷酸序列:在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤。

[0113] 在一些实施方案中,RCN3变体基因组核酸分子具有包含在对应于根据SEQ ID NO:2或其互补序列的位置13,482的位置处的鸟嘌呤的核苷酸序列。

[0114] 在一些实施方案中,IL4R α 拮抗剂和/或IL13阻断剂是本文所述的任何IL4R α 拮抗剂和IL13阻断剂,诸如杜匹单抗。在一些实施方案中,RCN3激动剂是本文所述的任何RCN3激动剂,诸如RCN3蛋白。

[0115] 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。

[0116] 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。除非另有说明,否则份数是重量份,温度是以℃计或处于环境温度,且压力处于或接近大气压。

[0117] 实施例

[0118] 实施例1:针对接受杜匹单抗治疗的哮喘受试者的年化恶化率进行全基因组关联研究(GWAS)

[0119] 为了确定与哮喘发病机制相关的基因和途径,对多个药物反应终点进行了GWAS。特别地,研究了DRI12544和EFC13579试验中接受杜匹单抗治疗的欧洲哮喘受试者的年化恶化率。杜匹单抗组中合并了DRI和EFC欧洲数据,从而提供了654名受试者的样本量。针对接受杜匹单抗治疗的受试者准备了药物反应终点(即年化恶化率)的曼哈顿图。发现RCN3附近的一个基因座达到全基因组显著性。

[0120] RCN3中的一个内含子变体19:49541484:C:G(ENST00000270645c.680-1069C>G; rs113886122)与接受杜匹单抗治疗的受试者的较高恶化率相关(表1)。

[0121] 表1

	MAF	P 值	效应 (LCI, UCI)	样品 (RR RA AA)
[0122]	0.129	1.92E-08	0.822 (0.535, 1.108)	649 464 140 9

[0123] 这种变体很常见,次要等位基因频率(MAF)接近13%。杜匹单抗治疗后,G等位基因携带者的年化恶化率高于非携带者。当考虑表达数量性状基因座(eQTL)和剪接数量性状基因座(sQTL)时,此变体还与基因型-组织表达(GTEX)中的RCN3表达减少相关(图1)。有趣的是,发现内含子变体分别是血液和肺组织中RCN3的eQTL和sQTL。对于表达,内含子变体与全血中RCN3表达的减少相关。对于剪接,与参考组装相比,内含子变体与已知外显子的剪接效率显著降低相关。使用LeafCutter(万维网“github.com/davidaknowles/leafcutter”)计算的内含子切除表型对剪接进行量化。

[0124] 确定携带0、1或两个19:49541484:C:G(rs113886122)等位基因的受试者的年化恶化率或恶化比例(图2;每组中按基因型分层的中位年化恶化率)。在杜匹单抗治疗组中,替代G等位基因的携带者以剂量依赖性方式具有更高的恶化率。观察到非携带者组(即C/C组由76%的欧洲入组受试者组成)的恶化率显著降低。然而,杜匹单抗治疗组中的携带者的恶化率仍然低于安慰剂组中携带者的恶化率。CC基因型在杜匹单抗治疗的患者中恶化程度最低。这表明,与参考等位基因相比,杜匹单抗治疗在携带一个或两个ALT等位基因的患者中是有效的,但幅度较小。这与此变体与RCN3表达减少相关,并且小鼠中RCN3敲除与肺发育异常或肺纤维化加剧相关的事实相一致。

[0125] 图3还示出,19:49541484:C:G(rs113886122)变体与杜匹单抗治疗的哮喘受试者中年化恶化率增加特异性相关。为了进一步理解19:49541484:C:G(rs113886122)变体的效应,考虑了其他临床测量结果(图4)。在杜匹单抗组(第1-5行)的分析中,观察到19:49541484:C:G(rs113886122)等位基因与哮喘失控或恶化的受试者比例增加的显著关联。第6-10行代表安慰剂组的数据,并且没有与19:49541484:C:G(rs113886122)变体相关的疾

病进展测量结果。第11-13行是基线特征,其中19:49541484:C:G(rs113886122) 变体与哮喘肺功能下降相关,如通过峰值呼气流速下降来测量。

[0126] 除了本文所述的修改之外,所描述主题的各种修改对于本领域技术人员来说将从前述描述中显而易见。此类修改也意图落在随附权利要求书的范围内。本申请中引用的每篇参考文献(包括但不限于期刊文章、美国和非美国专利、专利申请公布、国际专利申请公布、基因库登录号等)均通过引用以其整体且出于所有目的并入本文中。

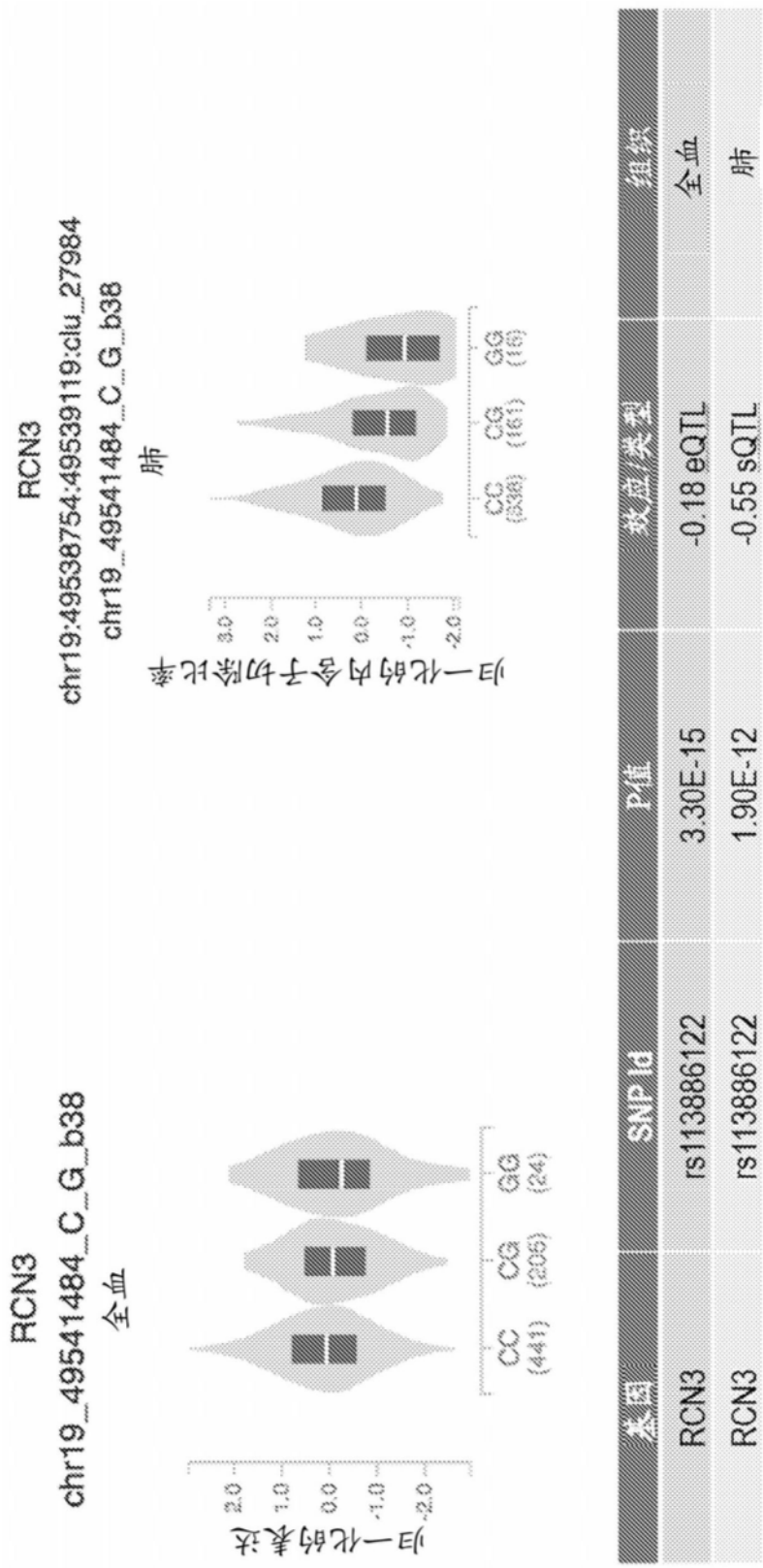


图1

	杜匹单抗	安慰剂
19:49541484:C:G_G	年化恶化率	年化恶化率
0 (C/C)	0.35 (464)	0.86 (201)
1 (C/G)	0.87 (140)	0.96 (55)
2 (G/G)	1.61 (9)	2.82 (7)
变体-治疗相互作用p值	8.7E-03	

图2

队列	症状	病例数量	AAF
DRI12544_EFC13579_EUR_杜匹单抗_安慰剂	EXAC_CT_X_TRT	926	0.13
DRI_EFC_杜匹单抗_EUR	EXAC_CT	649	0.129
EFC13579_EUR_杜匹单抗	EXAC_CT	422	0.139
DRI12544_EUR_杜匹单抗	EXAC_CT	225	0.109
DRI12544_EFC13579_EUR_安慰剂	EXAC_CT	277	0.131
EFC13579_EUR_安慰剂	EXAC_CT	226	0.14
DRI12544_EUR_安慰剂	EXAC_CT	51	0.092

图3

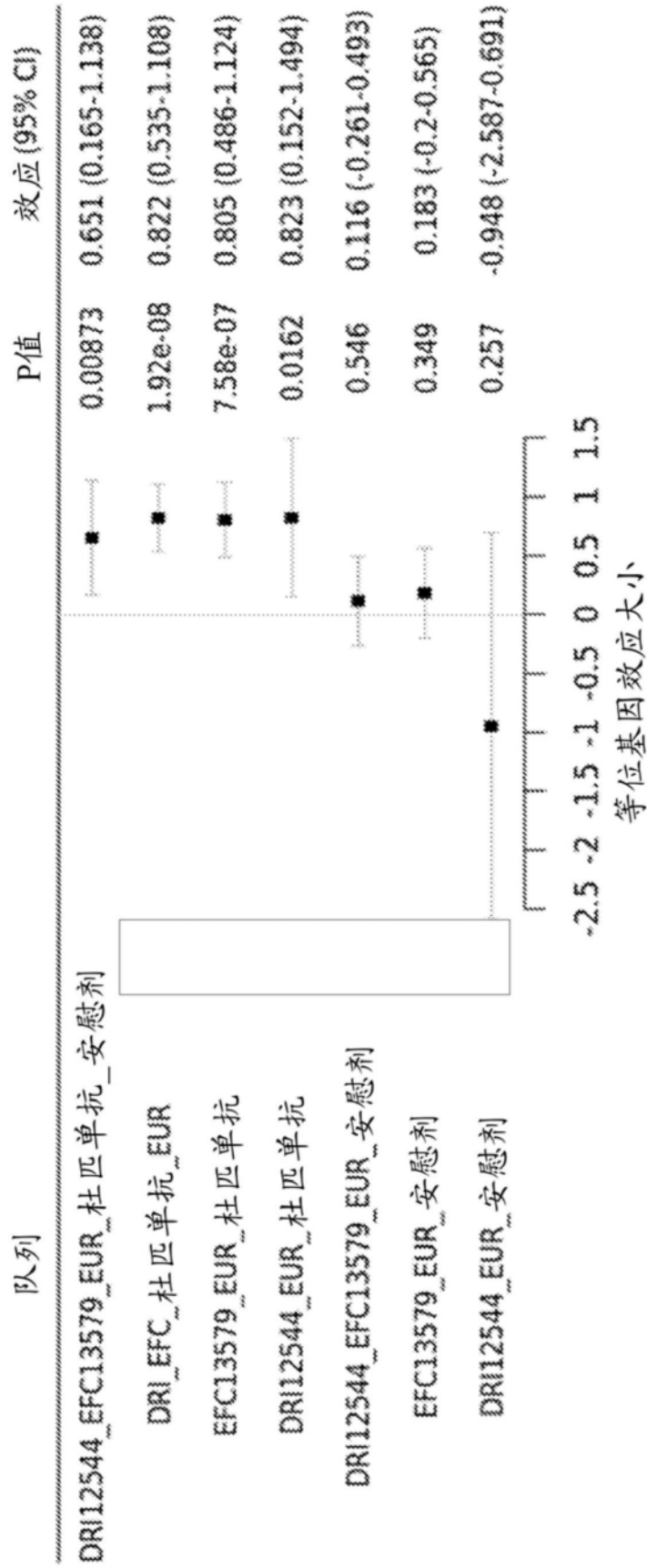


图3(续)

性状	组	效应	P值	AAF	病例数量	杂合病例	纯合病例	对照数量	杂合对照	纯合对照
哮喘失控%	杜匹单抗	1.684	3.62E-03	0.139	272	85	6	382	79	3
恶化%	杜匹单抗	2.039	1.33E-04	0.139	156	56	5	498	108	4
第12周FEV1	杜匹单抗	-0.108	1.85E-01	0.140	648	163	9			
第12周FEV1PP	杜匹单抗	-0.118	1.47E-01	0.140	648	163	9			
第12周AQLQ	杜匹单抗	-0.165	5.47E-02	0.140	576	143	9			
哮喘失控%	安慰剂	0.815	4.29E-01	0.136	161	33	4	115	28	3
恶化%	安慰剂	1.004	9.89E-01	0.136	100	20	4	176	41	3
第12周FEV1	安慰剂	0.022	8.42E-01	0.133	275	61	6			
第12周FEV1PP	安慰剂	0.026	8.12E-01	0.133	275	61	6			
第12周AQLQ	安慰剂	-0.041	7.57E-01	0.128	247	53	5			
红细胞基线	基线	0.039	4.83E-01	0.138	930	225	16			
下午峰值呼气流速	基线	-14.102	3.78E-02	0.138	929	225	16			
上午峰值呼气流速	基线	-13.618	4.69E-02	0.138	929	225	16			

图4