[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C07H 21/00
C12Q 1/68

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01122058.9

[45] 授权公告日 2004 年 10 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1169824C

[22] 申请日 2001.3.22 [21] 申请号 01122058.9

[30] 优先权

[32] 2000. 3.22 [33] JP [31] 080955/2000

[32] 2001. 3. 6 [33] JP [31] 062371/2001

[71] 专利权人 株式会东芝

地址 日本神奈川县

[72] 发明人 土方美奈子 三代俊治 太田裕彦 桥本幸二

审查员 周 洋

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 陈 昕

权利要求书 2 页 说明书 21 页 附图 5 页

[54] 发明名称 M ×A 蛋白质的多型基因及其应用

[57] 摘要

本发明提供一种用于预测干扰素疗法有效性的作为具有可形成有用指标的多型位点的多核苷酸，是具有序列 1 – 4 碱基序列的多核苷酸。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

1、一种预测干扰素疗法有效性的多核苷酸，是从下述序列组中选取的:

（at）下述序列表中序列1表示的多核苷酸、

（bt）对上述（at）所示多核苷酸中除455位外的1个或数个核苷酸进行缺失、置换、或附加修饰的多核苷酸、

（ct）含有序列1的441～455位表示的序列的多核苷酸、

（dt）含有序列1的449～459位表示的序列的多核苷酸、

（et）上述的互补链。

2、一种预测干扰素疗法有效性的多核苷酸，是从下述序列组中选取的，

（ag）下述序列表中序列2表示的多核苷酸、

（bg）对上述（ag）所示多核苷酸中除455位外的1个或数个核苷酸进行缺失、置换或附加修饰的多核苷酸、

（cg）含有序列2的441～455位表示的序列的多核苷酸、

（dg）含有序列2的449～459位表示的序列的多核苷酸、

（eg）上述的互补链。

3、一种预测干扰素疗法有效性的多核苷酸，是从下述序列组中选取的，

（aa）下述序列表中序列3表示的多核苷酸、

（ba）对上述（aa）表示的多核苷酸中除455位外的1个或数个核苷酸进行缺失、置换或附加修饰的多核苷酸、

（ca）含有序列3的441～455位表示的序列的多核苷酸、

（da）含有序列3的449～459位表示的序列的多核苷酸、

（ea）上述的互补链。

4、一种预测干扰素疗法有效性的多核苷酸，是从下述序列组中选取的，

（ac）下述序列表中序列4表示的多核苷酸、

（bc）对上述（ac）所示多核苷酸中除455位外的1个或数个核苷酸进行缺失、置换或附加修饰的多核苷酸、

（cc）含有序列4的441～455位表示的序列的多核苷酸、

（dc）含有序列4的449～459位表示的序列的多核苷酸、

（ec）上述的互补链。

5、一种多核苷酸，是权利要求1~4中任1项记载的多核苷酸，进而包含至少1个增加的与该多核苷酸连接的选自以下基因组成的组的多核苷酸，即启动子、增强子、上游活化序列、沉默基因、上游抑制序列、衰减子、聚A尾、核转移信号、Kozak序列、ISRE、耐药性因子、信号肽的基因、跨膜区域的基因、标记蛋白的基因、干扰素应答性蛋白质的基因、非干扰素应答性蛋白质的基因。

6、一种预测干扰素疗法有效性的方法，是对要给以干扰素的个体，预测干扰素疗法有效性的方法，其特征在于包括以下步骤，

1）从上述个体采取含有多核苷酸试样的步骤，该多核苷酸至少含有1个干扰素应答序列、

2）对至少1个上述干扰素应答序列，确定从位于3'末端起2号位点核苷酸的步骤。

7、根据权利要求6记载的方法，其特征是还包括3）的预测步骤，即，上述核苷酸若是胸腺嘧啶的话，预测干扰素疗法对上述个体是有效的。

8、根据权利要求6记载的方法，其特征是还包括3）的预测步骤，即，上述核苷酸若是鸟嘌呤，腺嘌呤或胞嘧啶的话，预测干扰素疗法对上述个体无效的可能性很高。

9、根据权利要求6记载的方法，其特征是上述个体是感染了丙型肝炎病毒的个体。

10、根据权利要求6~9中任1项记载的方法，其特征是至少含有1个干扰素应答序列的上述多核苷酸是权利要求1－4中任1项记载的多核苷酸。

11、一种试剂，是对要给以干扰素的个体预测干扰素疗法是否有效的试剂，其特征在于含有权利要求1~4中任一项记载的多核苷酸。

12、一种探针，是用于检测MxA基因启动子区域中多型的探针，由权利要求1~4中任1项记载的多核苷酸形成。

13、权利要求1~5中任何一项记载的多核苷酸在用于预测干扰素疗法的有效性的应用。

MxA蛋白质的多型基因及其应用

本发明是关于MxA基因启动子区域的多型基因，和以使用该多型基因预测作为干扰素疗法对象的个体中的干扰素有效性的预测方法。

干挠素是脊椎动物细胞分泌的蛋白质，具有抗病毒性作用、免疫调节作用和抑制细胞增殖的作用。因此，干挠素广泛用于治疗丙型肝炎等各种病毒性感染症和恶性肿瘤等。然而，至今已知存在对干扰素不显示感受性的患者，如果对干扰素疗法不显示效果的感染者持续进行干扰素疗法，这不仅仅使患者引起发热和贫血等副作用，而且也延误了其他疗法的治疗。因此，希望能预先预测干扰素的有效性，使这种非感受性的患者能排除掉干扰素的疗法。

另一方面知道，从对流感病毒具有耐受性的小鼠发现了干扰素依赖性的蛋白质，即MxA蛋白质，在人中也发现了这种MxA蛋白质。还知道这种MxA蛋白质对流感病毒的耐受性有关，最近报导在慢性丙型肝炎病毒（以下称HCV）的感染者中，发现MxA mRNA和MxA蛋白质的水平关连到感染者对干扰素疗法的应答。这一事实暗示出，MxA基因可成为用于在治疗前预测干扰素疗法的有效性的指标。

本发明者们对关于HCV感染者对干扰素疗法的应答性的MxA基因启动子区域中多型基因的存在进行了调查研究。结果知道了仅仅是具有特定多型基因的患者对干扰素有感受性，干扰素疗法才有效。

鉴于上述情况，本发明的第一个课题是提供一种对患者预测干扰素疗法的有效性有用的MxA基因启动子区域中的多型基因。

本发明的第二个课题是提供用上述MxA基因启动子区域中的多型基因，预测干扰素对患者有用性的方法。

本发明的第三个课题是使用上述MxA基因启动子区域的多型基因之中作为干扰素感受性原因的多型基因，进行使对干扰素非感受性的患者成为干扰素感受性的基因治疗，以及提供用于该目的的载体。

上述课题，通过以下叙述的本发明即可达到。

根据本发明的第一个侧面，提供从下述序列组中选取的，用于预测干扰素疗法有效性的多核苷酸:

（at）下述序列表中序列1所示的多核苷酸、

（bt）对上述（at）中所示多核苷酸中除455位外的1个或数个核苷酸，进行缺失、置换、或附加修饰的多核苷酸、

（ct）含有序列1的441～455位所示序列的多核苷酸、

（dt）含有序列1的449～459位所示序列的多核苷酸、

（et）上述的互补链。

根据本发明的第二个侧面，提供从下述序列构成的组中选取的，用于预测干扰素疗法有效性的多核苷酸：

（ag）下述序列表中序列2所示的多核苷酸、

（bg）对在上述（ag）中所示多核苷酸中除455位外的1个或数个核苷酸，进行缺失、置换或附加修饰的多核苷酸、

（cg）含有序列2的441～455位所示序列的多核苷酸、

（dg）含有序列2的449～459位所示序列的多核苷酸、

（eg）上述的互补链。

根据本发明的第三个侧面，提供从下述序列构成的组中选取的、用于预测干扰素疗法有效性的多核苷酸：

（aa）下述序列表中序列3中所示多核苷酸、

（ba）对在上述（aa）中所示多核苷酸中除455位外的1个或数个核苷酸进行缺失、置换、或附加修饰的多核苷酸、

（ca）含有序列3的441～455位所示序列的多核苷酸、

（da）含有序列3的449～459位所示序列的多核苷酸、

（ea）上述的互补链。

根据本发明的第四个侧面，提供从下述序列构成的组中选取的，用于预测干扰素疗法有效性的多核苷酸：

（ac）下述序列表中序列4中所示的多核苷酸、

（bc）对在上述（ac）中所示多核苷酸中除455位外的1个或数个核苷酸进行缺失、置换、或附加修饰的多核苷酸、

（cc）含有序列4的441～455位所示序列的多核苷酸、

（dc）含有序列4的449～459位所示序列的多核苷酸、

（ec）上述的互补链。

根据本发明的第五个侧面，是提供一种预测给以干扰素个体干扰素疗法有效性的方法，该方法包括以下步骤:

1）从上述个体采取至少含有 1 个干扰素应答序列的多核苷酸试样的步骤;和

2）对于至少 1 个上述干扰素应答序列，确定位于自 3'末端第 2 号位置的核苷酸的步骤。

该方法中，上述核苷酸若是胸腺嘧啶，可以预测干扰素疗法对上述个体是有效的。上述核苷酸若是鸟嘌呤、腺嘌呤或胞嘧啶的话，可以预测干扰素疗法对上述个体无效的可能性很高。

根据本发明的第六个侧面，提供一种试剂，是预测给以干扰素个体的干扰素疗法是否有效的试剂，特征是含有权利要求 1～4 中任一项记载的多核苷酸。

根据本发明的第七个侧面，提供一种探针，是为检测 MxA 基因启动子区域内多型基因的探针，由权利要求 1～4 中任何 1 项记载的多核苷酸形成的探针。

根据本发明的第八个侧面，提供一种为预测干扰素的有效性，而对上述干扰素的应用。

根据本发明的第九个侧面，是提供一种使干扰素非感受性的个体具有干扰素感受性的载体，其特征是含有上述多核苷酸（at）～（et）中的任一种。

根据本发明的第十个侧面，提供一种方法，是使干扰素非感受性的个体具有干扰素感受性的方法，包括向干扰素非感受性的个体，导入本发明多核苷酸。

根据本发明的第十一个侧面，提供一种在制造使干扰素非感受性个体具有干扰素感受性的医药在中的上述多核苷酸（at）～（ec）中任何一种的应用。

根据本发明的第十二个侧面，提供一种导入了上述多核苷酸（at）～（ec）中任何一种的非人转基因动物。

图 1 是表示 MxA 基因启动子区域内碱基序列图。

图 2 是使用了 HhaI 的 RFLP 电泳图。

图 3～6 是将在该启动子的支配下的虫萤光素酶活性作为指标，对各个具有 4 种类型 SNP（T 型、G 型、A 型、C 型）的 MxA 启动子，比较 Hela 细胞内干扰素 α 的应答性的结果示意图。

图 7 是导入基因的 Ptnk 载体结构的模式示意图。

以下详细说明本发明。

序列 1、序列 2、序列 3、和序列 4 的多核苷酸是包含了干扰素依赖性蛋白质人 MxA 基因启动子区域的多核苷酸，本发明者们初次发现存在于这些多核苷酸的 455 位的单核苷酸多型性（Single nucleotide polymorphism）（以下称 SNP）对干扰素疗法效果的应答性有关。

在各种多核苷酸的 441～456 位上存在着干扰素应答序列（interferon-stimulated response element）（以下称 ISRE）。

序列 1 中 441～456 位的 ISRE 碱序列是「GGTTTCGTTTCTGCTC」（序列 5），ISRE 的第 15 位（相当于序列 1 的 455 位，在序列 1 中的 455 位，根据通常将转录起始位点取为＋1 的表示方法，相当于－88 位）是胸腺嘧啶。

序列 2 中的 441～456 位的 ISRE 碱基序列是「GGTTTCGTTTCTGCGC」（序列 6）、ISRE 的第 15 位（相当于序列 2 的 455 位。序列 2 中 455 位，根据通常将转录起始位点取为＋1 的表示方法，相当于－88 位）是鸟嘌呤。

序列 3 中 441～456 位的 ISRE 碱基序列是「GGTTTCGTTTCTGCAC」（序列 7）、ISRE 的第 15 位（相当于序列 3 的 455 位。序列 3 中 455 位，根据通常将转录起始位点取为＋1 的表示方法，相当于－88 位）是腺嘌呤。

序列 4 中的 441～456 位的 ISRE 碱基序列是「GGTTTCGTTTCTGCCC」（序列 8）、ISRE 的第 15 位（相当于序列 4 的 455 位。序列 4 中 455 位，根据通常将转录起始位点取为＋1 的表示方法，相当于－88 位）是胞嘧啶。

以下在本说明书中，将序列 1、序列 2、序列 3 和序列 4 的 455 位，称作 SNP 位点（SNP Site）。

除了这些 ISRE 的 SNP 位点以外的区域。在各个序列都是一样的。这些 ISRE 中，具有 15 位的核苷酸为胸腺嘧啶的 ISRE（序列 5）的 HCV 感染者，对干扰素疗法是有效的，不具有 15 位的核苷酸为胸腺嘧啶 ISRE（序列 5）的 HCV 感染者，干扰素疗法是无效的，本发明者们已从流行病学的角度得到证实。

即，如实施例中详述的那样，具有以纯合 455 位核苷酸为鸟嘌呤的序列 1 的多核苷酸（以下简写为 G／G 同型）的 HCV 感染者，与具有以杂合 455 位核苷酸为胸腺嘧啶的序列 1 的多核苷酸和 455 位核苷酸为鸟嘌呤的序列 1 的启动子区域（以下记作 G／T 异型）的 HCV 感染者，或具有以同型结合序列 1 的多核苷酸（以下记作 T／T 同型）的 HCV 感染者相比较，证实干扰素疗法是无效的。

或者，具有以纯合 455 位核苷酸不为胸腺嘧啶的 MxA 基因启动子区域的 HCV

感染者（以下记作非-T/非-T 同型）与 T/非-T 异型或 T／T 异型的 HCV 感染者比较，显示出干扰素疗法是无效的。作为非-T/非-T 同型的组合，有 G／G、G／A、G／C、A／A、A／C、C／C。作为 T/非-T 组合，有 T／G、T／A、T／C。

因此，在实施干扰素疗法之前，例如首先确定在包含 HCV 感染者所具有的人 MxA 基因启动子区域的多核苷酸的 ISRE 中 SNP 位点的核苷酸，可以检测知道干扰素疗法对该 HCV 感染者的有效性。

根据上述发现，本发明提供了一种预测干扰素疗法有效性的多核苷酸。并提供一种对要给以干扰素的个体，预测干扰素疗法是否有效的方法。为了检测被检者是否具有上述哪一种 SNP，根据本发明还提供多核苷酸作为探针的应用。

另外，还提供一种基因疗法，以使干扰素非感受性的个体获得干扰素感受性。

此外，还提供作为实验动物有意义的、含有上述核苷酸的非人转基因动物。

以下分别对本发明的各个侧面进行说明。

〈用于预测干扰素疗法有效性的多核苷酸〉

本说明书中，所谓的「多核苷酸」是指 2 个以上核苷通过磷酸酯键连接而成的物质，「核苷」中包括脱氧核糖核苷和核糖核苷，但不限于这些。进而本发明中的所谓「多核苷酸」，也是指肽核酸、吗啉核酸、甲基磷酸酯核酸、S－寡核酸等人工合成核酸。

本说明书中的所谓「启动子区域」，不仅指 TATA 盒等与转录起始反应直接有关的区域，也是指包括该区域附近或较远处存在的对转录起始反应效率有影响的调节序列在内的序列。因此，对于形成「启动子区域」的术语，必须注意到与转录起始反应有关的序列、调节序列，还包括连接两者的序列。

所谓「ISRE」是指因干扰素α、β、γ或ω的刺激诱导的在基因的转录调节区域内存在的由约 12～15 个核苷酸形成的碱基序列。

本发明的多核苷酸包括以下（a）～（e）。

（a）序列 1，2，3，4 中任一个表示的多核苷酸。

（b）在上述（a）中显示的多核苷酸中，对除 455 位以外的 1 个或数个核苷酸进行缺失、置换、或附加修饰的多核苷酸。

作为缺失的实例，有 128 位、133 位、152 位、508 位及 543 位的缺失，作为置换的实例，有 330 位的置换（G→T）、542 位的置换（G→G）、作为附加的实例，有向 501 位的附加（C）。

作为利用附加修饰的多核苷酸其他实例，有在上述序列 1，2，3，4 的多核苷酸或上述多核苷酸的片段上结合从以下组中选出的至少 1 个多核苷酸而形成的多核苷酸，即，包括启动子、增强子、上游活化序列、沉默基因、上游游抑制序列、衰减子、聚 A 尾、核转移信号、Kozak 序列、ISRE、耐药性因子、信号肽的基因、跨膜区域基因、包括萤光素、绿色荧光蛋白、藻菁甙、辣根过氧化酶在内的标记蛋白的基因、干扰素应答性蛋白质的基因、非干扰素应答性蛋白质的基因。

序列 1，2，3，4 中显示的上述多核苷酸的碱基序列中，与干扰素疗法有效性有关的是存在于 455 位 SNP 位点的 1 个核苷酸，本发明的多核苷酸也可以是含有上述 455 位的 SNP 位点的多核苷酸片段。这种多核苷酸最好是 11～30 个核苷酸。当多核苷酸片段的长度过长时，难以识别 1 个核苷酸的不同。另一方面，在基体中，多核苷酸的长度过短时，难以确定试样中所含多核苷酸的碱基序列。

作为特别适宜的多核苷酸，有下述（c）～（e）。

（c）是包括上述 455 位的 SNP 位点的序列 1、序列 2、序列 3、序列 4 的多核苷酸片段，包括具有相当于序列 1、序列 2、序列 3、序列 4 中的 441～456 位的序列 5、序列 6、序列 7、序列 8 所表示的序列的多核苷酸（即上述 ISRE）在内的片段。

（d）是包括上述 455 位的 SNP 位点的序列 1、序列 2、序列 3、序列 4 的多核苷酸片段，包括相当于序列 1～4 的 449～459 位的序列 9、10、11、12 的多核苷酸在内的片段。特别是（d）大致以上述 SNP 为中心，由于含有前后同等长度的碱基序列，所以可以高精度进行碱基序列的确定。为了进行更高精度的检测，最好是含有相当于序列 1～4 的 447～461 位的多核苷酸的片段。

进而作为本发明适用的多核苷酸，也可以是（e）在上述（a）～（d）中显示的多核苷酸的互补链。

由上述序列 5、序列 6、序列 7、序列 8 表示的序列（即上述 ISRE）的互补链是序列 13、14、15、16 表示的序列。

上述序列 9、序列 10、序列 11、序列 12 表示的序列的互补链，是分别以序列 17、序列 18、序列 19、序列 20 表示的序列。

〈预测干扰素疗法是否有效的方法〉

根据本发明，在实施干扰素疗法之前，首先确定某 HCV 感染者的上述 SNP 核苷酸，可预测干扰素疗法对该 HCV 感染者是否有效。到此，由于以往还不能事前

判断干扰素疗法对某个个体是否有效，所以这种预测成为可能，其意义极大。

故此，本发明是对要给以干扰素的感染 HCV 的个体，预测干扰素疗法是否有效的方法。所提供的方法包括以下步骤。

1)从上述个体采取试样的步骤，该试样含有序列 1 的多核苷酸、或具有 441～456 位碱基序列的该多核苷酸片段，

2）对位于上游侧的上述 ISRE，确定从 3'末端起 2 号位点的核苷酸的步骤，和

3）如果上述核苷酸是胸腺嘧啶，预测干扰素疗法对上述个体是有效的步骤。

本发明提供了方法，还包括代替该方法的步骤 3)，上述核苷酸若是鸟嘌呤、腺嘌呤或胞嘧啶的话，预测干扰素疗法对上述个体无效可能性很高的预测步骤。

由于干扰素疗法的适应症不限于丙型肝炎，所以本发明是对要给以干扰素的个体，预测干扰素疗法是否有效的方法。提供的方法包括以下步骤。

1）从上述个体采取试样的步骤，该试样含有至少含有 1 个干扰素应答序列的多核苷酸，

2）对至少 1 个上述干扰素应答序列，确定从 3'末端起 2 号位点的核苷酸的步骤，和

3）上述多核苷酸若是胸腺嘧啶，预测对上述个体干扰素疗法是有效的步骤。

本发明提供的方法，还包括替代该方法的步骤 3)，上述核苷酸若是鸟嘌呤、腺嘌呤或胞嘧啶的话，预测干扰素疗法对上述个体无效可能性很高的预测步骤。

可适用本发明的个体，是患有干扰素疗法有效的疾病的患者，最好是患有干扰素α，β或ω有效的疾病的患者。上述个体也可以是健康者。对于干扰素α，β或ω有效的疾病，除了丙型肝炎外，还有胶质母细胞瘤、髓瘤、星细胞瘤、皮肤恶性黑色素瘤、乙型肝炎、肾癌、多发性骨髓瘤、毛细胞白血病、慢性骨髓性白血病、亚急性硬化性全脑炎、病毒性脑炎、免疫抑制患者全身性带状疱疹及水痘、上咽头未分化癌、伴有听力低下的病毒性内耳感染症、疱疹性角膜炎、偏平湿疣、尖锐湿疣、腺病毒及疱疹病毒感染引发的结膜炎、生殖器疱疹、口唇疱疹、子宫颈癌、癌性胸水症、角化棘皮瘤、基底细胞癌、δ型慢性活动性肝炎，但并不仅限于这些。

为了实施本发明的方法，首先从适用本方法的个体采取含有多核苷酸的试样，该多核苷酸含有干扰素应答序列。成为本发明方法的对象「个体」，可以是

包括人、犬、猫、牛、山羊、猪、绵羊及猴在内的任意哺乳动物，人是最合适的个体。

「含有干扰素应答序列的多核苷酸」，可以是含有对干扰素应答性蛋白质进行编码的基因上游处存在的控制序列（启动子区域等）的多核苷酸，但并不限于此。最好的「含干扰素应答序列的多核苷酸」，是序列 1－4 的多核苷酸，或者含有那些 441～456 位多核苷酸的多核苷酸片段。

由于体内广泛含有多核苷酸，所以从个体采取的任意试样都可以成为「含有含干扰素应答序列的多核苷酸的试样」。最好的试样是血液。

从个体采取试样后，通常的操作是从该试样中提取多核苷酸。作为从生物体成分中提取多核苷酸的方法，例如，除了酚提取、乙醇沉淀外，还可使用任意的提取方法。提取 mRNA 时，也可以用寡 dT 柱。

当多核苷酸的量很少时，根据需要，可进行多核苷酸扩增的操作。扩增操作，例如按照包括逆转录聚合酶链反应（RT－PCR）在内的聚合酶链反应（以下记作 PCR）进行。

根据需要，进行提取操作和／或扩增操作后，确定从至少 1 个干扰素应答序列的 3'末端起 2 号位点的核苷酸种类。

在确定核苷酸的种类中，最一般的是使用一对夹带含有所要确定核苷酸的干扰素应答序列的引物，将干扰素应答序列扩增后，或可以不扩增，确定该干扰素应答序列的碱基序列。

所要确定的核苷酸，存在于限制酶的识别位点中时，也可用限制酶片段长多型法。例如，确定上述 MxA 基因启动子区域的多型时，455 位的核苷酸是鸟嘌呤的序列 3 的 ISRE，通过可特异性识别并切断碱基序列 GCGC 的限制酶 HhaI 进行切割，与此相反，455 位的核苷酸不是鸟嘌呤时，不会被 HhaI 切割。因此，在鉴定序列 1 的 455 位核苷酸时，可使用采用 HhaI 的 RFLP 法。

除此之外，作为确定多型的方法，可以使用 PCR－SSP（PCR-特异序列引物法、PCR－Specific Sequence Primers）法、点印迹法与 PCR 组合的 PCR－SSO 法（PCR-序列特异寡核苷酸法，PCR－Sequeme Specitic Oligonucleotide），及 PCR－SSCP 法等公知的方法，对此没有限定。

所谓点印迹法是使用已知序列的探针核酸链，检测试样中所含具有特定序列的核酸链的一种方法。该方法是将单链核酸的试样固定在基板上的有机薄膜上，

接着使用以荧光物质等标记的单链的探针核酸链溶液与该薄膜上的试样接触。若试样具有和探针核酸链互补的序列的话，和探针核酸链发生杂交，形成双链，而固定在基板上。因此，利用洗涤除去未反应的核酸链后，通过检测付在探针上的标记，即可检测出与探针相对具有互补序列的试样核酸链。因此，本发明也包括在 MxA 蛋白质的多型基因的检测中，本发明的多核苷酸作为探针的应用。以含有权利要求 1~4 中任何 1 项记载的多核苷酸作为特征的，预测干扰素疗法对要给以干扰素的个体是否有效的试剂也包含在本发明内。

根据上述方法，确定从干扰素应答序列的 3'末端起 2 号位点的核苷酸种类，该核苷酸若是胸腺嘧啶的话，可以预测干扰素疗法是有效的。或者，根据这种方法，该核苷酸若是鸟嘌呤、腺嘌呤或胞嘧啶的话，可以预测干扰素疗法对上述个体无效的可能性很高。

〈基因治疗〉

如上述，为了使干扰素疗法对个体有效，该个体必须具有从下述序列组中选出的多核苷酸。

（at）下述序列表中序列 1 显示的多核苷酸、

(bt)对上述（at）显示多核苷酸中除 455 位外的 1 个或数个核苷酸进行缺失、置换或附加修饰的多核苷酸、

（ct）含有序列 1 的 441~455 位表示序列的多核苷酸、

（dt）含有序列 1 的 449~459 位表示序列的多核苷酸、

（et）上述的互补链。

因此，上述核苷酸（at）~（et）可用于使干扰素疗法有效的基因治疗，对于干扰素疗法无效的个体，通过导入这些多核苷酸，使该个体获得干扰素感受性。

即，本发明中使干扰素非感受性个体获得干扰素感受性的方法，包括对干扰素非感受性的个体，导入上述多核苷酸（at）~（et）中任何一种的方法。另外，还包括含有权利要求 1 中记载的多核苷酸，使干扰素非感受性的个体获得干扰素感受性的载体。另外还包括权利要求 1 记载的多核苷酸在使干扰素非感受性个体获得干扰素感受性的医药制造中的应用。

上述本发明的载体也可以用于转化合适的宿主进行表达，制造付与干扰素感受性的蛋白质时。

〈转基因动物〉

若使用本发明的多核苷酸，按常规方法，可制作非人转基因动物。这种非人转基因动物可用作研究干扰素功能的实验动物。

以下根据实施例更详细说明本发明。

实施例 1

在本实施例中，具有以杂合型或纯合型 MxA 基因启动子区域－88 位（在序列 1 的碱基序列中相当于 455 位）的核苷酸是胸腺嘧啶的基因（以下记作 MxA（T））的 HCV 感染者，与具有以纯合该核苷酸为鸟嘌呤的基因（以下记作 MxA（G））的 HCV 感染者进行比较，证实对干扰素疗法的应答性很好。

〈受验人〉

从组织学上证明是慢性丙型肝炎的，进行干扰素疗法的 115 名患者，和抗 HCV 阴性的健康者 42 名参加了本次研究。这些参加者全是日本人，相互间无血缘关系。

115 名患者中，52 名患者干扰素疗法结束后，在至少 6 个月的追踪观察期间，血清丙氨酸转氨酶的水平处于正常范围，而且是 HCV 的 RNA 一直处于阴性的持续应答者（以下记作 SR），63 名患者与 ALT 水平无关，追踪观察中，HCV 的 RNA 仍是处于阳性，或者是丙型肝炎复发的非应答者（以下记作 NR）。所有患者均给以总量超过 300 万单位的干扰素α和／或β。

〈MxA 基因分析〉

从患者和健康对照采集的 PBMC 提取核酸。将该核酸进行 PCR，扩增包含 MxA 基因启动子区域的 599 核苷酸的 DNA。

PCR 的概况如下

将 0.05μg 核酸与 Taq-Gold（Perkin Elner）、序列 5 的寡核苷酸引物#MXAF01（正向引物，－569～－540 位）、和序列 6 的寡核苷酸引物#MXAF02（反向引物、＋30～＋1 位）混合后（－560～－540 位相当于序列 1 的碱基序列 47～76 位），在[95℃10 分钟]、[95℃10 秒钟、68℃60 秒钟]×55、[72℃7 分钟]的循环条件下，进行反应。通过直接译码 PCR 产物，确定 157 个试样中 12 个的序列。

根据序列确定，同时确定扩增区域中 SNP 位点后，构建用于可识别地检出等位基因核苷酸的 RFLP 系统。用 HhaI(GCG↓C)消化所有患者的 599 核苷酸的 PCR 产物，在琼脂糖凝胶中进行电泳，研究是生成 482 核苷酸的带，还是生成 533 核苷酸的带，还是两者都生成。

<统计分析>

进行 Yates 补正，或不进行补正，根据费希尔的概率试验比较小组数据。将 P<0.05 视为统计学上有显著性的。

<结果>

通过12个样品的序列确定，同时确定MxA基因启动子区域中的多型位点。在该启动子区域的－88位上存在SNP（G和T）、该SNP包含在类似图1所示的ISRE区域中。

接着，用HhaI进行的RFLP，对全部157个样品确定MxA基因的基因型。在该分析中，在多型位点上有鸟嘌呤的试样，在电泳凝胶中显示出482核苷酸的带。与此相反，当鸟嘌呤换成胸腺嘧啶时，由于HhaI识别的限制位点消失，而显示出533核苷酸的带。在具有以杂合多型位点为鸟嘌呤的启动子区域和多型位点为胸腺嘧啶的启动子区域时，会同时检测出482核苷酸的带和533核苷酸的带（见图2）。

如表1所示，在NR组中，62％的患者具有以纯合上述多型位点为鸟嘌呤的启动子区域（G·G同型）、在SR组中，31％的患者是G·G同型（p＝0.0009; SR对NR）。与此相反，在NR组中，35％的患者具有以杂合多型位点为鸟嘌呤的启动子区域和多型位点为胸腺嘧啶的启动子区域（G·T杂异）、在SR组中，60％的患者是G·T异型（p=0.0082; SR对NR）。T·T同型的患者，在NR组中为3.2％，在SR组中为10％（p=0.2956; SR对NR）。

具有多型位点为鸟嘌呤的启动子区域的等位基因频率，在SR组中为0.606，在NR组中为0.794（p=0.0018; SR对NR）。

表1

MxA 启动子 -88 位的多型	SR 患者 (n=52)	NR (n=63)	健康对照 (n=42)	p: SR 对 NR
等位基因频率				
G	0.606	0.794	0.714	0.0018
T	0.394	0.296	0.286	0.0018
接合型				
G · G 同型	16(31%)	39(62%)	20(48%)	0.0009
G · T 异型	31(60%)	22(35%)	20(48%)	0.0082
T · T 同型	5(10%)	2(3.2%)	2(4.8%)	0.2956*

*进行 Yates 补正。

与 NR 组相比，SR 组中，G ·G 相同的个体可以说是显著的要少，上述结果，也明确了患者不依赖于感染的 HCV 的基因型。

表2

位于 MxA 启动子-88 位的 SNP 接合型	SR 患者	NR 患者	p: SR 对 NR
基因型为 1b 的 HCV 感染患者	n=18	n=42	
G · G 同型	5(28%)	26(62%)	0.0321*
G · T 异型	12(67%)	14(33%)	0.0170
T · T 同型	1(5.6%)	2(4.8%)	0.6051*
基因型为 2a 或 2b 的 HCV 感染患者	n=34	N=21	
G · G 同型	11(32%)	13(62%)	0.0318
G · T 异型	19(56%)	8(38%)	0.1999
T · T 同型	4(12%)	0	0.2722*

*进行 Yates 补正。

从表 2 可明确，在基因型为 1b 的 HCV 感染患者组中（HCV 1b 组）和基因型为 2a 或 2b 的 HCV 感染患者组中（HCV 2a/2b），与在 NR 组中都是 62％的 G · G 同

型的个体相对，在SR组中、G·G同型的个体分别为28%和32%。从表2所示结果可知，不管患者感染的HCV基因型如何，在SR组中，G·G同型的个体显著的要少（HCV 1b组；p=0.0321、HCV 2a/2b组，p=0.0318）。

以上由本实施例证实，具有以杂合或纯合上述多型位点为胸腺嘧啶的MxA启动子区域的HCV感染者，与感染的HCV基因型无关，对干扰素疗法显示出很高的应答性。

本实施例也暗示出，具有以杂合或纯合上述多型位点不为鸟嘌呤MxA启动子区域的HCV感染者，对干扰素疗法也显示出很高的应答性。

由于上述多型位点存在于ISRE中，所以可以说，这些情况也适合于除丙型肝炎以外的其他疾病。

实施例2

正如从实施例1明确的，MxA启动子的SNP为T型的HCV感染者，通过给以干扰素，对肝炎的治疗效果很高。另一方面，其SNP为G型时治疗效果很低。可以以这种理由进行解释，为完成ISRE功能的碱基序列是T型，对于干扰素的刺激做出正确应答，但G型与其序列仅之1个碱基的差异，对于干扰素的刺激就没有应答，MxA蛋白质的生成量很低。

从这种状况考虑时，可以推测MxA启动子的SNP为C型及A型的HCV肝炎患者，和G型的一样，MxA启动子对干扰素没有应答，其治疗效果很低。

为证明这些事实，在MxA启动子的下流构建具有萤光素酶基因的质粒，并将其转感染人细胞（HeLa细胞、及卵巢癌细胞）。对于具有4种SNP（T型、G型、A型、C型）的MxA启动子，分别研究作为它们对干扰素应答的结果，即产生萤光素酶活性。

其结果示于图3～图6。图3是用干扰素α在Hela细胞内进行诱导的实例，图4是用干扰素α在卵巢癌细胞内进行诱导的实例，图5是用干扰素β在Hela细胞内进行诱导的实例，图6是用干扰素β在卵巢癌细胞内进行诱导的实例。这些图中，+号表示添加干扰素时的萤光素酶活性，－号表示没有添加干扰素时的萤光素酶活性。这些结果均为3次试验的平均值，其标准差以条线棒表示。

从图中可知，任何一种情况，T型的MxA启动子均呈现出最高的值。具有A型和C型SNP的HCV肝炎患者和G型的情况一样，干扰素及对干扰素的应答很低。因此，可预测利用干扰素的治疗效果很低。

实施例3

在本实施例中，对利用导入 MxA 基因的胚性干细胞（以下记作 ES 细胞）生成MxA蛋白质进行说明。

按照 PCR 法，使用引物#MXAF01（序列 5）、#MXAR02（序列 6），对含有 MxA 基因启动子区域的－88碱基为T的基因（MxA（T））和G的基因（MxA（G））的区域进行扩增。

接着，将扩增产物以磷酸钙法分别转染 ES 细胞。反应条件全部按照已知的条件。使 IFN－α作用于这些细胞，以Northern印迹对MxA蛋白质的产生量进行比较。

从结果可知，导入 MxA（G）基因的细胞，与没导入基因的细胞比较，可以确认MxA蛋白质的生成量约为1.2倍。另一方面，导入MxA（T）基因的细胞中，约为对照细胞的2.5倍，与导入MxA（G）基因的细胞比较，显示出约2倍的MxA蛋白质量。

根据本实施例可明确，通过在ES细胞中导入MxA（T）基因，可大量生成MxA蛋白质。

从本实施例的结果暗示出，通过使用导入 MxA（T）基因的 ES 细胞，可以对干扰素有效的疾病进行基因治疗。

利用导入 MxA 基因的 ES 细胞，可制成嵌合性动物。进而使嵌合性动物进行交配，可得到转基因动物。

实施例4：向ES细胞导入基因

将 ES 细胞在 ES／LIF 培养基内培养后，利用电穿孔法进行基因导入。电穿孔法的条件如下。

〈液组成〉：20mmol/L-HEPES(pH7.3)、137mmol/L-NaCl、5mmol/L-KCl、0.7mmol/L-Na_2HPO_4、6mmol/L－葡萄糖、0.1mmol/L-2-巯基乙醇。

〈条件〉：450V、250μF、10分钟，室温、4mm 比色杯。

电穿孔法处理后，将细胞转移到ES／LIF培养基内，按照已报导的，使用200μg/L 的氨基糖苷磷酸转移酶（G418）和2μmol/L 的更昔洛韦（GANC），选取导入基因的细胞。从得到的细胞提取DNA，用Southern杂交确认导入的目的片段。

根据本实施例可以明确，使用电穿孔法，可在ES细胞内导入基因。

实施例5

本实施例中，对向载体中导入MxA基因进行说明。

以PCR法，使用引物#MXAF01（序列5）、#MXA R02（序列6），对含有MxA基因启动子区域－88碱为胸腺嘧啶的基因（MxA（T））和鸟嘌呤的基因（MxA（G））的区域进行扩增。接着将扩增产物导入 pNTK 载体中（图 7）。反应条件按照已报导的条件。用限制酶将载体切断成直链后，用于向细胞导入。

使用导入MxA基因的载体，向靶细胞内导入MxA基因，可改进对干扰素的应答性。

实施例6

本实施例中，说明用导入MxA基因的ES细胞生成MxA蛋白质。

使 IFN－α作用于导入 MxA（T）或 MxA（G）基因的这些细胞，比较 MxA 蛋白质的产生量。以 Northern 印迹法进行比较，结果可知在导入 MxA（G）基因的细胞中，与没进行任何作用的细胞比较，约生成1.5倍的MxA蛋白质。另一方面，在导入 MxA（T）基因的细胞中，约为控制细胞的 4.5 倍，和导入 MxA（G）基因的细胞比较，显示出3倍的值。

从以上结果暗示出，使用导入 MxA（T）基因的 ES 细胞，可对干扰素有效的疾病实施基因治疗。

序列表

<110> 株式会社东芝

<120> MxA蛋白质的多型基因及其应用

<130> A000001162

<140>
<141>

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 581
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
atgagccaga ctccagggag gcctagaagt gggcaagggg aaacgggaaa ggaggaagat 60
ggtatgggtg tgcctggtta ggggtgggag tgctggacgg agttcgggac aagaggggct 120
ctgcagccat tggcacacaa tgcctgggag tccctgctgg tgctgggatc atcccagtga 180
gccctgggag ggaactgaag acccccaatt accaatgcat ctgttttcaa aaccgacggg 240
gggaaggaca tgcctaggtt caaggatacg tgcaggcttg gatgactccg ggccattagg 300
gagcctccgg agcaccttga tcctcagacg ggcctgatga aacgagcatc tgattcagca 360
ggcctgggtt cgggcccgag aacctgcgtc tcccgcgagt tcccgcgagg caagtgctgm 420
aggtgcgggg ccaggagcta ggtttcgttt ctgctcccgg agccgccctc agcacagggt 480
ctgtgagttt catttcttcg ccggcgcggg gcggggctgg gcgcggggtg aaagaggcga 540
accgagagcg gaggccgcac tccagcactg cgcagggacc g 581

<210> 2
<211> 581
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
atgagccaga ctccagggag gcctagaagt gggcaagggg aaacgggaaa ggaggaagat 60
ggtatgggtg tgcctggtta ggggtgggag tgctggacgg agttcgggac aagaggggct 120
ctgcagccat tggcacacaa tgcctgggag tccctgctgg tgctgggatc atcccagtga 180
gccctgggag ggaactgaag acccccaatt accaatgcat ctgttttcaa aaccgacggg 240
gggaaggaca tgcctaggtt caaggatacg tgcaggcttg gatgactccg ggccattagg 300

gagcctccgg agcaccttga tcctcagacg ggcctgatga aacgagcatc tgattcagca 360
ggcctgggtt cgggcccgag aacctgcgtc tcccgcgagt tcccgcgagg caagtgctgm 420
aggtgcgggg ccaggagcta ggtttcgttt ctgcgcccgg agccgccctc agcacagggt 480
ctgtgagttt catttcttcg ccggcgcggg gcggggctgg gcgcggggtg aaagaggcga 540
accgagagcg gaggccgcac tccagcactg cgcagggacc g 581

<210> 3
<211> 581
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
atgagccaga ctccagggag gcctagaagt gggcaagggg aaacgggaaa ggaggaagat 60
ggtatgggtg tgcctggtta ggggtgggag tgctggacgg agttcgggac aagaggggct 120
ctgcagccat tggcacacaa tgcctgggag tccctgctgg tgctgggatc atcccagtga 180
gccctgggag ggaactgaag acccccaatt accaatgcat ctgttttcaa aaccgacggg 240
gggaaggaca tgcctaggtt caaggatacg tgcaggcttg gatgactccg ggccattagg 300
gagcctccgg agcaccttga tcctcagacg ggcctgatga aacgagcatc tgattcagca 360
ggcctgggtt cgggcccgag aacctgcgtc tcccgcgagt tcccgcgagg caagtgctgm 420
aggtgcgggg ccaggagcta ggtttcgttt ctgcacccgg agccgccctc agcacagggt 480
ctgtgagttt catttcttcg ccggcgcggg gcggggctgg gcgcggggtg aaagaggcga 540
accgagagcg gaggccgcac tccagcactg cgcagggacc g 581

<210> 4
<211> 581
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
atgagccaga ctccagggag gcctagaagt gggcaagggg aaacgggaaa ggaggaagat 60
ggtatgggtg tgcctggtta ggggtgggag tgctggacgg agttcgggac aagaggggct 120
ctgcagccat tggcacacaa tgcctgggag tccctgctgg tgctgggatc atcccagtga 180
gccctgggag ggaactgaag acccccaatt accaatgcat ctgttttcaa aaccgacggg 240
gggaaggaca tgcctaggtt caaggatacg tgcaggcttg gatgactccg ggccattagg 300
gagcctccgg agcaccttga tcctcagacg ggcctgatga aacgagcatc tgattcagca 360
ggcctgggtt cgggcccgag aacctgcgtc tcccgcgagt tcccgcgagg caagtgctgm 420
aggtgcgggg ccaggagcta ggtttcgttt ctgcccccgg agccgccctc agcacagggt 480
ctgtgagttt catttcttcg ccggcgcggg gcggggctgg gcgcggggtg aaagaggcga 540
accgagagcg gaggccgcac tccagcactg cgcagggacc g 581

<210> 5
<211> 16
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5
ggtttcgttt ctgctc 16

<210> 6
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
ggtttcgttt ctgcgc 16

<210> 7
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
ggtttcgttt ctgcac 16

<210> 8
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
ggtttcgttt ctgccc 16

<210> 9
<211> 10
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
ttctgctcccg 10

<210> 10
<211> 10
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10

ttctgcgcccg 10

<210> 11
<211> 10
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
ttctgcacccg 10

<210> 12
<211> 10
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
ttctgcccccg 10

<210> 13
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
gagcag aaacgaaacc 16

<210> 14
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
gcgcag aaacgaaacc 16

<210> 15
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
gtgcag aaacgaaacc 16

<210> 16

<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 16
gggcag aaacgaaacc 16

<210> 17
<211> 10
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 17
cgggagcagaa 10

<210> 18
<211> 10
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 18
cgggcgcagaa 10

<210> 19
<211> 10
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 19
cgggtgcagaa 10

<210> 20
<211> 10
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 20
cgggggcagaa 10

<210> 21
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工合成序列

<220>
<223> 对人工合成序列的描述: 引物

<400> 21
acacacccgt ttccaccctg gagaggccag 30

<210> 22
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工合成序列

<220>
<223> 对人工合成序列的描述: 引物

<400> 22
tgcgcagtgc tggagtgcgg cctccgctct 30

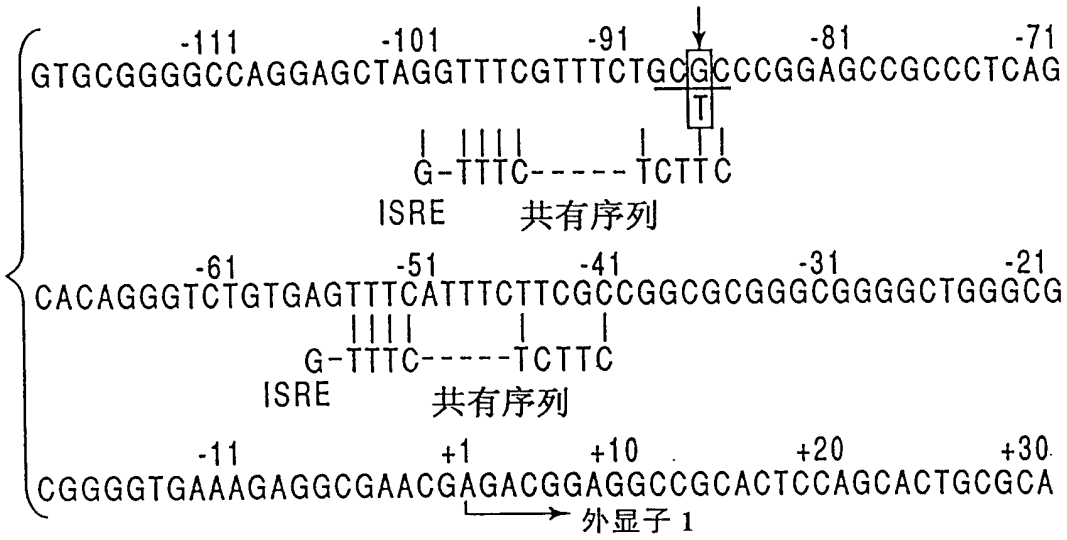
-111 -101 -91 -81 -71
GTGCGGGGCCAGGAGCTAGGTTTCGTTTCTGCGCCCGGAGCCGCCCTCAG
T
G-TTTC-----TCTTC
ISRE 共有序列
-61 -51 -41 -31 -21
CACAGGGTCTGTGAGTTTCATTTCTTCGCCGGCGCGGGCGGGGCTGGGCG
G-TTTC-----TCTTC
ISRE 共有序列
-11 +1 +10 +20 +30
CGGGGTGAAAGAGGCGAACGAGACGGAGGCCGCACTCCAGCACTGCGCA
外显子 1

图 1

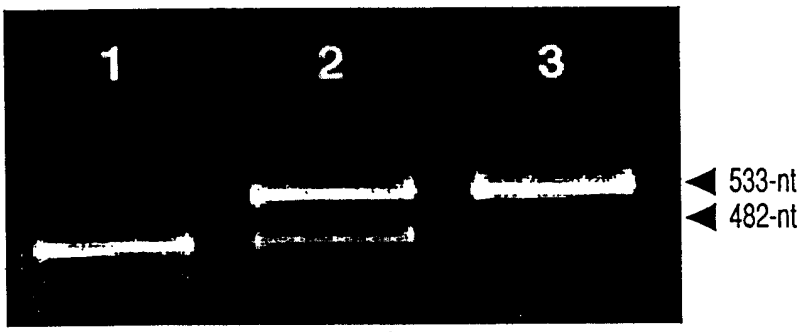

图 2

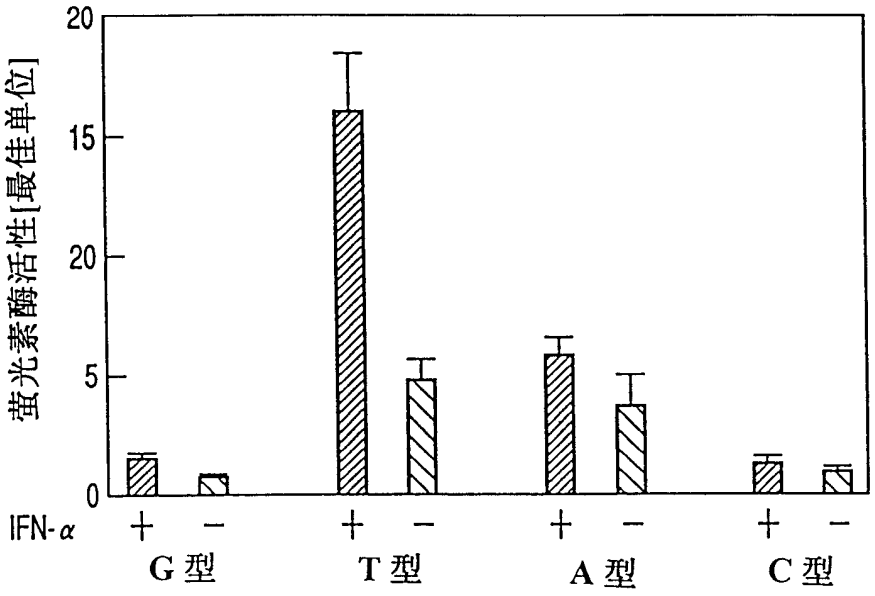
萤光素酶活性[最佳单位]
20
15
20
5
0
IFN-α
+
−
+
−
+
−
+
−
G 型
T 型
A 型
C 型

图 3

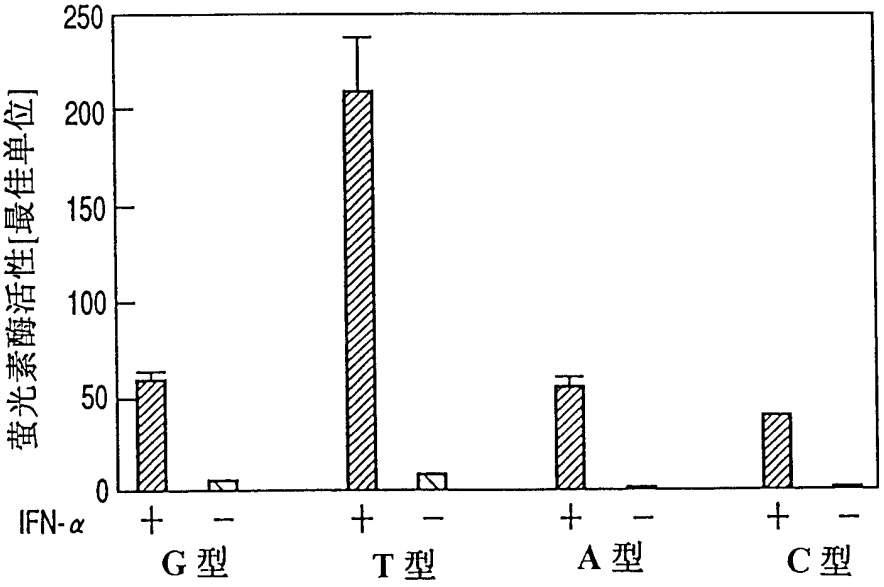
萤光素酶活性[最佳单位]
250
200
150
100
50
0
IFN-α
+
−
+
−
+
−
+
−
G 型
T 型
A 型
C 型

图 4

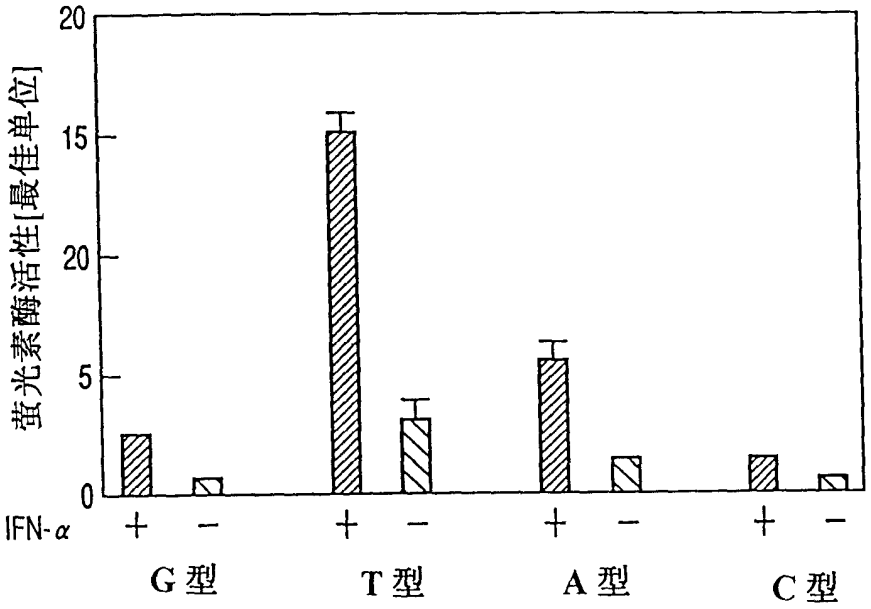
萤光素酶活性[最佳单位]
20
15
20
5
0
IFN-α
+
−
+
−
+
−
+
−
G 型
T 型
A 型
C 型

图 5

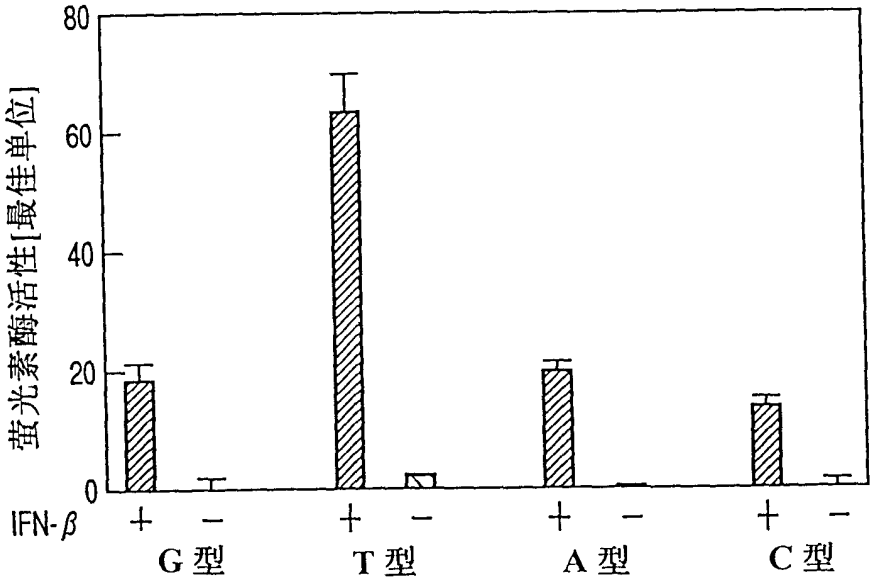
萤光素酶活性[最佳单位]
80
60
40
20
0
IFN-β
+
−
+
−
+
−
+
−
G 型
T 型
A 型
C 型

图 6

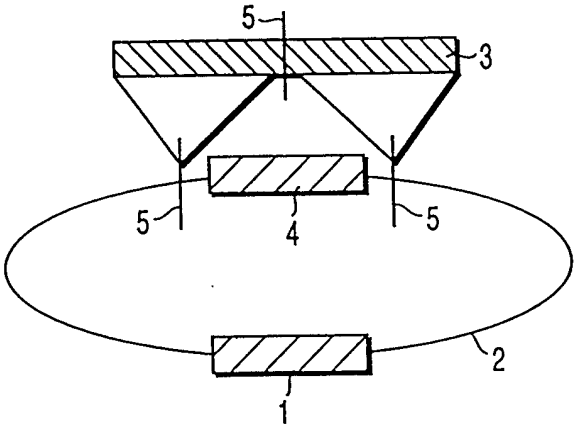

图 7