

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-504054

(P2004-504054A)

(43) 公表日 平成16年2月12日(2004.2.12)

|                           |                   |                  |
|---------------------------|-------------------|------------------|
| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | F I               | テーマコード (参考)      |
| <b>C 1 2 N 15/09</b>      | C 1 2 N 15/00     | Z N A A          |
| <b>A O 1 K 67/027</b>     | A O 1 K 67/027    | 2 G O 4 5        |
| <b>C O 7 K 14/47</b>      | C O 7 K 14/47     | 2 G O 6 0        |
| <b>C O 7 K 16/18</b>      | C O 7 K 16/18     | 4 B O 2 4        |
| <b>C 1 2 N 1/15</b>       | C 1 2 N 1/15      | 4 B O 6 3        |
|                           |                   | 4 B O 6 4        |
|                           | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 | (全 169 頁) 最終頁に続く |

|               |                              |          |                     |
|---------------|------------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2002-513866 (P2002-513866) | (71) 出願人 | 500189230           |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年7月19日 (2001.7.19)       |          | ユニバーシティ・オブ・ユタ・リサーチ・ |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成15年1月20日 (2003.1.20)       |          | ファウンデーション           |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2001/022639            |          | アメリカ合衆国84108ユタ州ソルト・ |
| (87) 国際公開番号   | W02002/008381                |          | レイク・シティ、アラピーン・ドライブ6 |
| (87) 国際公開日    | 平成14年1月31日 (2002.1.31)       |          | 15番、スウィート110        |
| (31) 優先権主張番号  | 60/219,738                   | (74) 代理人 | 100062144           |
| (32) 優先日      | 平成12年7月20日 (2000.7.20)       |          | 弁理士 青山 稔            |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      | (74) 代理人 | 100086405           |
|               |                              |          | 弁理士 河宮 治            |
|               |                              | (74) 代理人 | 100106231           |
|               |                              |          | 弁理士 矢野 正樹           |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬物誘導型心臓不整脈に係る S C N 5 A 中の一般的多型

## (57) 【要約】

本発明は、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワントまたは心室細動を引起こす S C N 5 A 中の特定の突然変異に指向される。該突然変異を有する個人は、ある種の薬剤を投与した場合に、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワントまたは心室細動を発病し易い。この素因は、個人の S C N 5 A の D N A 配列を分析することによって本発明により診断し得る。該突然変異について個人をスクリーニングすることによって、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワントまたは心室細動を回避し得る。さらに、薬物を試験して、それがトルサード・デ・ポワントまたは心室細動を引起こすかを判定し得る。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号：4 で示されるポリペプチドをコードする核酸を含む単離された DNA。

## 【請求項 2】

配列番号：1 で示される DNA に核酸プローブがハイブリダイズするのを妨害するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で請求項 1 記載の DNA に特異的にハイブリダイズする核酸プローブ。

## 【請求項 3】

請求項 2 記載のプローブの薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動に対する素因を引起す多型を含む核酸に対するハイブリダイゼーションは許容するが該プローブの配列番号：1 で示される核酸に対するハイブリダイゼーションは妨害するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、DNA または RNA の患者の試料に該プローブをハイブリダイズさせることを含み、ここにハイブリダイゼーションシグナルの存在が該多型の存在を示すことを特徴とする該多型を診断する方法。

10

## 【請求項 4】

患者の DNA または RNA を増幅させておき、該増幅 DNA または RNA をハイブリダイズさせる請求項 3 記載の方法。

## 【請求項 5】

ハイブリダイゼーションをイン・サイチュ (in situ) で行う請求項 3 記載の方法。

20

## 【請求項 6】

配列番号：4 で示されるポリペプチドをコードする SCN5A を生じる多型の存在を同定する手段によって行う、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動に対する素因を引起すヒト SCN5A 中の多型の存在を診断する方法。

## 【請求項 7】

該手段が、

- a) 一本鎖立体構造多型技術を用いて該多型についてアッセイし；
  - b) ヒト SCN5A を配列決定し；
  - c) RNアーゼアッセイを行い；
  - d) 対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションを行い；
  - e) 単一塩基伸長アッセイを行い；
  - f) 対立遺伝子特異的ポリメラーゼ連鎖反応を行い；
  - g) 患者の試料からの SCN5A 遺伝子の全体または一部分を増幅させて増幅配列を作成し、その増幅配列を配列決定し；
  - h) 患者の試料からの SCN5A 遺伝子の全体または一部分を分子クローン化してクローン化配列を作成し、そのクローン化配列を配列決定し；
  - i) 患者の試料中の SCN5A 遺伝子配列を増幅させ、その増幅配列を野生型 SCN5A 遺伝子配列を含む核酸プローブにハイブリダイズさせ；
  - j) 該組織中の SCN5A 遺伝子配列を増幅させ、その増幅配列を突然変異 SCN5A 遺伝子配列を含む核酸プローブにハイブリダイズさせ；
  - k) SCN5A 遺伝子配列または突然変異 SCN5A 遺伝子配列を含む 1 またはそれを超える核酸プローブを用いて患者の試料からの SCN5A 遺伝子のイン・サイチュ・ハイブリダイゼーションを測定し；
  - l) イムノブロットングを行い；ついで
  - m) 免疫組織化学を行う
- ことを含む請求項 6 記載の方法。

30

40

## 【請求項 8】

配列番号：4 で示される単離されたポリペプチド。

## 【請求項 9】

請求項 8 記載のポリペプチドに結合するが、野生型 SCN5A ポリペプチドには結合しな

50

い抗体。

【請求項 10】

患者の試料と請求項 9 記載の抗体とを反応させることによって患者における突然変異 S C N 5 A ポリペプチドの存在についてアッセイすることからなり、ここに陽性の反応が薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動に対する素因を示すことを特徴とする薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動に対する素因を診断する方法。

【請求項 11】

該抗体がモノクローナル抗体である請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

該アッセイがイムノブロットィングを含む請求項 10 記載の方法。

10

【請求項 13】

該アッセイが免疫組織化学技術を含む請求項 10 記載の方法。

【請求項 14】

個人からの S C N 5 A ポリペプチドを配列決定するかまたは該個人由来の核酸から合成した S C N 5 A ポリペプチドを配列決定することを含み、ここにアミノ酸残基 1 1 0 3 にチロシンが存在することが薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動に対する素因を示すことを特徴とする該個人における薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動に対する素因を診断する方法。

【請求項 15】

請求項 1 記載の D N A でトランスフェクトした細胞。

20

【請求項 16】

請求項 1 記載の単離された D N A を含むベクター。

【請求項 17】

請求項 16 記載のベクターでトランスフェクトした細胞。

【請求項 18】

請求項 1 記載の D N A を含む非ヒト - トランスジェニック動物。

【請求項 19】

( a ) 突然変異を有する S C N 5 A を発現する第 1 のセットの細胞を浴用溶液に入れ；  
 ( b ) 工程 ( a ) の細胞において第 1 の誘導 N a <sup>+</sup> 電流を誘導し；  
 ( c ) 該第 1 の誘導 N a <sup>+</sup> 電流を測定し；  
 ( d ) 野生型 S C N 5 A を発現する第 2 のセットの細胞を浴用溶液に入れ；  
 ( e ) 工程 ( d ) の細胞において第 2 の誘導 N a <sup>+</sup> 電流を誘導し；  
 ( f ) 該第 2 の誘導 N a <sup>+</sup> 電流を測定し；  
 ( g ) 薬剤を工程 ( a ) の浴用溶液に添加し；  
 ( h ) 工程 ( g ) の細胞において第 3 の誘導 N a <sup>+</sup> 電流を誘導し；  
 ( i ) 該第 3 の誘導 N a <sup>+</sup> 電流を測定し；ついで  
 ( j ) 該第 3 の誘導 N a <sup>+</sup> 電流が第 1 の誘導 N a <sup>+</sup> 電流よりも第 2 の誘導 N a <sup>+</sup> 電流により類似しているかを判定し、ここに第 1 の誘導 N a <sup>+</sup> 電流よりも第 2 の誘導 N a <sup>+</sup> 電流に近接する第 3 の誘導 N a <sup>+</sup> 電流を生じる薬剤が該個人を治療するのに有用であることを含み、該突然変異が配列番号： 4 で示されるポリペプチドをコードする S C N 5 A を生じることを特徴とする、 S C N 5 A 中に突然変異を有する個人を治療するのに有用である薬剤をスクリーニングする方法。

30

40

【請求項 20】

該第 1 のセットの細胞、該第 2 のセットの細胞または両セットの細胞をトランスジェニック動物から得る請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

該第 1 のセットの細胞、該第 2 のセットの細胞または両セットの細胞をヒト S C N 5 A の R N A でトランスフェクトする請求項 19 記載の方法。

【請求項 22】

( a ) 野生型 S C N 5 A を発現する細胞を浴用溶液に入れて電流を測定し；

50

- (b) 工程 (a) の細胞において第 1 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を誘導し；
- (c) 該第 1 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を測定し；
- (d) 突然変異  $\text{SCN5A}$  (ここに該突然変異  $\text{SCN5A}$  は配列番号：4 で示されるポリペプチドをコードする) を発現する細胞を浴用溶液に入れて電流を測定し；
- (e) 工程 (d) の細胞において第 2 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を誘導し；
- (f) 該第 2 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を測定し；
- (g) 薬剤を工程 (d) の浴用溶液に入れ；
- (h) 工程 (g) の細胞において第 3 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を誘導し；
- (i) 該第 3 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を測定し；ついで
- (j) 該薬剤が、該第 2 の誘導  $\text{Na}^+$  電流と比較して該第 1 の誘導  $\text{Na}^+$  電流により類似するかまたはあまり類似しない該第 3 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を生じるかを判定することを含み

10

ここに該第 2 の誘導  $\text{Na}^+$  電流よりも該第 1 の誘導  $\text{Na}^+$  電流により類似する該第 3 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を生じる薬剤が薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を治療または予防するのに有用であることを特徴とする、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を治療または予防するのに有用である薬剤をスクリーニングする方法。

【請求項 23】

- i) 工程 (a) の該細胞、ii) 工程 (d) の該細胞または iii) 工程 (a) および (d) の該細胞を  $\text{RNA}$  でトランスフェクトする請求項 22 記載の方法。

20

【請求項 24】

- (a) 野生型  $\text{SCN5A}$  でトランスフェクトしたトランスジェニック動物を調製し；
- (b) 該トランスジェニック動物のトランスジェニック細胞において第 1 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を誘導し；
- (c) 該第 1 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を測定し；
- (d) 突然変異  $\text{SCN5A}$  でトランスフェクトしたトランスジェニック動物を調製し、ここに該突然変異  $\text{SCN5A}$  は配列番号：4 で示されるポリペプチドをコードし；
- (e) 工程 (d) のトランスジェニック動物のトランスジェニック細胞において第 2 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を誘導し；
- (f) 該第 2 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を測定し；
- (g) 薬剤を工程 (d) のトランスジェニック動物に投与し；
- (h) 工程 (g) の該トランスジェニック動物のトランスジェニック細胞において第 3 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を誘導し；
- (i) 該第 3 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を測定し；ついで
- (j) 該第 3 の誘導  $\text{Na}^+$  電流が該第 2 の誘導  $\text{Na}^+$  電流と比較して該第 1 の誘導  $\text{Na}^+$  電流により類似しているかまたはあまり類似していないかを判定することを含み、ここに該第 2 の誘導  $\text{Na}^+$  電流よりも該第 1 の誘導  $\text{Na}^+$  電流により類似する該第 3 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を生じる薬剤が薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を治療または予防するのに有用であることを特徴とする薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を治療または予防するのに有用である薬剤についてスクリーニングする

30

方法。

40

【請求項 25】

- a) 突然変異  $\text{SCN5A}$  (ここに該突然変異  $\text{SCN5A}$  は配列番号：4 で示されるポリペプチドをコードする) を発現する細胞を浴用溶液に入れて電流を測定し；
- b) 工程 (a) の細胞において第 1 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を誘導し；
- c) 該第 1 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を測定し；
- d) 薬剤を工程 (c) の浴用溶液に添加し；
- e) 工程 (d) の細胞において第 2 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を誘導し；
- f) 該第 2 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を測定し；ついで
- g) 該薬剤が該第 1 の誘導  $\text{Na}^+$  電流とは異なる該第 2 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を生じるかを判

50

定し、ここに異なる電流が誘導された場合に、該薬剤が該患者にトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を誘導する危険性を有するとすることを含む該薬剤が該患者にトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を誘導する危険性を有するかを判定する方法。

【請求項 26】

該細胞をトランスジェニック動物から得る請求項 25 記載の方法。

【請求項 27】

該細胞を配列番号：4 で示されるポリペプチドをコードするヒト SCN5A の RNA でトランスフェクトする請求項 25 記載の方法。

【請求項 28】

- a) 突然変異 SCN5A でトランスフェクトしたトランスジェニック動物を調製し、ここに該突然変異 SCN5A は配列番号：4 で示されるポリペプチドをコードし； 10
  - b) 工程 (a) の該トランスジェニック動物のトランスジェニック細胞において第 1 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を誘導し；
  - c) 該第 1 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を測定し；
  - d) 薬剤を該トランスジェニック動物に投与し；
  - e) 工程 (d) の該トランスジェニック動物のトランスジェニック細胞において第 2 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を誘導し；
  - f) 該第 2 の誘導  $\text{Na}^+$  電流を測定し；ついで
  - g) 該第 2 の誘導  $\text{Na}^+$  電流が該第 1 の誘導  $\text{Na}^+$  電流とは異なるかを判定し；
- ここに異なる電流を生じる薬剤が配列番号：4 で示されるポリペプチドをコードする遺伝子を含む個人にトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を誘導する危険性を示すことを特徴とするトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を誘導する危険性を示す薬剤をスクリーニングする方法。 20

【請求項 29】

- (a) 突然変異 SCN5A でトランスフェクトしたトランスジェニック動物を調製し、ここに該突然変異 SCN5A は配列番号：4 で示されるポリペプチドをコードし；
- (b) 薬剤を工程 (a) のトランスジェニック動物に投与し；ついで
- (c) 該薬剤が該トランスジェニック動物に薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を誘導したかを判定することを含むトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を誘導する危険性を示す薬剤をスクリーニングする方法。 30

【請求項 30】

- a) 請求項 15 記載の宿主細胞を準備し；
- b) 試験すべき化合物の不存在下で配列番号：4 で示されるタンパク質の活性を測定し；
- c) 該宿主細胞と該化合物とを接触させ；ついで
- d) 該化合物の存在下で該タンパク質の該活性を測定することを含み、ここに工程 (b) で測定した活性と工程 (d) で測定した活性との間の差異が該化合物による調節を示すことを特徴とする配列番号：4 で示されるタンパク質の活性を該化合物が調節できるかを判定する該化合物を試験する方法。

【請求項 31】

該宿主細胞を RNA でトランスフェクトする請求項 30 記載の方法。 40

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

心臓不整脈による突然死は全自然死の 11% と概算される。不整脈は頻繁に薬物療法、最も一般的には抗不整脈薬剤から生じる。

【0002】

QT 延長症候群 (LQTS) は、心電図上での QT 間隔の延長ならびに失神、発作および突然死の存在によって特徴付けられる心血管障害である。Romano-Ward 症候群、LQTS の常染色体優性形態においては 5 の遺伝子が関係付けられている。これらの遺伝子は KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1 および KCNE2 である。KV 50

L Q T 1 および K C N E 1 中の突然変異は、常染色体劣性様式で遺伝する表現型異常である聾と関連する L Q T S 形態であるジャーベル・ランゲ・ニールセン症候群をも引き起こす。

#### 【0003】

本発明は、S C N 5 A 遺伝子中の変化ならびに該変化を検出するための方法に関する。

本明細書中で用いる刊行物および他の材料は、発明の背景を説明し、または実施に関するさらなる詳細を供し、出典明示して本明細書の一部とみなし、簡便性のために、各々、添付する参考文献のリストにグループ化する。

本発明は、薬物誘導型トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動と関連している S C N 5 A 遺伝子中およびその遺伝子産物中の変化、ならびにこれらの障害の診断および予防方法に指向される。これらの薬物誘導型の身体的障害は、試験すべき個人の S C N 5 A 遺伝子の D N A 配列を分析し、その D N A 配列を正常遺伝子の公知の D N A 配列と比較することによって、本発明により診断する。薬物誘導型トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動の予測により、医療実務者は、既存の医療療法を用いてこの障害を予防することができる。

10

#### 【0004】

心臓不整脈は、全自然死のほぼ 11% と概算される、病的状態および死亡の一般的な原因である (K a n n e l , 1987 ; W i l l i c h r a , 1987)。一般的に、生命を脅かす心室不整脈を患う個人の前症候的な診断および治療はほとんど存在せず、医療管理が実際には不整脈および死の危険性を増大する場合もある (C a r d i a c A r r y t h m i a S u p p r e s s i o n T r i a l I I I n v e s t i g a t o r s , 1992)。これらの因子により、心臓不整脈の危険の高い個人の早期の検出および不整脈の予防は、優先順位が高いものとなっている。

20

#### 【0005】

遺伝性および後天性の両方の因子が、心臓不整脈を発病する危険性に寄与している。Q T 延長症候群 (L Q T) は、心室不整脈、詳細にはトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動、から突然の意識喪失、失神、発作および突然死を引き起こす先天性の心臓不整脈である (W a r d , 1964 ; R o m a n o , 1965 ; S c h w a r t z r a , 1975 ; M o s s r a , 1991)。この障害は通常若年期のほか、健康な個人でも起こる (W a r d , 1964 ; R o m a n o , 1965 ; S c h w a r t z , 1975)。大部分の L Q T 遺伝子は心電図上における Q T 間隔の明白な延長、異常な心臓再分極の徴候を運搬している (V i n c e n t r a , 1992)。L Q T の臨床的な特徴は、エピソード的な心臓不整脈、詳細にはこの不整脈および心室細動における心電図の特徴的な波形性質について命名された、トルサード・デ・ポワンツのような再分極に関連する心室不整脈から生じる (S c h w a r t z r a , 1975 ; M o s s および M c D o n a l d , 1971)。トルサード・デ・ポワンツは、心室細動、特に致死不整脈に変性し得る。L Q T は一般的な診断ではないが、心室不整脈は非常に一般的であり、300,000 人を超える合衆国国民が毎年突然死亡している (K a n n e l r a , 1987 ; W i l l i c h r a , 1987)。そして、多くの症例において、根底にある機作は異常な心臓再分極とし得る。したがって、L Q T は、分子レベルで生命を脅かす心臓不整脈を研究する唯一の機会を提供する。

30

40

#### 【0006】

先天性および後天性の両方の形態の L Q T が明らかにされている。後天性 L Q T および続発性の不整脈は、心臓虚血、徐脈ならびに低い血清カリウムまたはカルシウム濃度のごとき代謝異常から生じ得る (Z i p e s , 1987)。L Q T は、抗生物質、抗ヒスタミン剤、全身麻酔を含む特定の薬物療法、および最も一般的には抗不整脈薬剤療法を用いた治療からも生じ得る (Z i p e s , 1987)。先天性形態の L Q T は、少なくとも 5 の異なる遺伝子中の突然変異から発生し得る。以前の研究においては、L Q T 遺伝子座は染色体 11p15.5 (K V L Q T 1 または L Q T 1) (K e a t i n g r a , 1991a ; K e a t i n g r a , 1991b)、7q35-36 (z H E R G または L Q T 2)、3p21-24 (S C N 5 A または L Q T 3) (J i a n g r a , 1994) にマッピング

50

ングされた。これらの中で、先天性LQTの最も一般的な原因はKVLQT1である。本発明者らのデータは、この遺伝子中の突然変異が50%を超える先天性LQTの原因であることを示している。第4のLQT遺伝子座(LQT4)は4q25-27にマッピングされた(Schottら, 1995)。また、KCNE1(LQT5)も、QT延長症候群と関連付けられている(Splawskiら, 1997b; Duggalら, 1988)。これらの遺伝子は心臓活動電位の発生に関与するイオンチャンネルをコードする。突然変異はチャンネル機能喪失および延長型の心細胞再分極に通じ得る。心筋でのチャンネル発現の領域的ヘテロジェネイティー(heterogeneity)のため、異常な心臓再分極は不整脈の基礎を作り出している。KVLQT1およびKCNE1は内耳においても発現している(Neyroudら, 1997; Vetterら, 1996)。本発明者らは、これらの各遺伝子の同型接合または複合異型接合突然変異が聾およびジャーベル・ランゲ・ニールセン症候群の重篤な心臓表現型(Neyroudら, 1997; Splawskiら, 1997a; Schultze-Bahrら, 1997; Tysonら, 1997)を引起し得ることを示している。耳における機能性チャンネルの消失は明らかに内リンパの生成を破壊し、聾に通じる。

10

20

30

40

50

#### 【0007】

現在、LQTの前症候診断は心電図のQT間隔の延長に基づいている。0.44秒よりも長いQTc(心臓の速度に対して補正したQT間隔; Bazzeett, 1920)は、伝統的にその個人が患っていると分類している。しかしながら、大部分のLQT患者は心電図を有していない若年であるか、さもなくば健全な個人である。さらに、遺伝的研究により、QTcは感受性でも特異的でもないことが示されている(Vincentら, 1992)。遺伝子キャリアーおよび非キャリアーについてのQTc間隔のスペクトルは重複し、誤分類に通じる。非キャリアーはQT延長間隔を有し得、患っていると診断される。逆に言えば、 $\leq 0.44$ 秒のQTc間隔を有するLQT遺伝子キャリアーも存在するが、なお不整脈について危険性の高い状態にある。正確な前症候診断は、LQTの有効な遺伝子-特異的な治療のために重要である。

#### 【0008】

この障害の常染色体優性および常染色体劣性形態が報告されている。常染色体劣性LQT(ジャーベル・ランゲ・ニールセン症候群としても知られている)は、先天的神経性聾と関連付けられており;この形態のLQTは稀である(JervellおよびLange-Nielsen, 1957)。常染色体優性LQT(Romano-Ward症候群)はより一般的であり、他の表現型異常と関連付けられていない(Romanoら, 1963; Ward, 1964)。後天性LQTに酷似する障害も、通常、薬理学的療法の結果として獲得し得る(Schwartzら, 1975; Zipes, 1987)。

#### 【0009】

データは、LQTにおける不整脈の機構について意味を有する。LQTについての2の仮説が以前から提唱されている(Schwartzら, 1994)。その1は、左自律神経神経感応の優性が異常な心臓再分極および不整脈を引起すことを示している。この仮説は、右側の星状神経節の切除によってイヌにおいて不整脈が誘導し得るという知見によって支持されている。また、逸話的な事実は、 $\beta$ -アドレナリン遮断剤によっておよび右側の星状神経節摘出術によって効果的に治療されるLQT患者が存在することを示している(Schwartzら, 1994)。LQTに関連する不整脈についての第2の仮説は、心臓に特異的なイオンチャンネル遺伝子または心臓のイオンチャンネルを調節する遺伝子における突然変異が筋細胞再分極延長を引起すことを示している。筋細胞再分極延長はL型カルシウムチャンネルの再活性化を促進して、二次的な脱分極を生じ得るであろう(JanuaryおよびRiddle, 1989)。これらの二次的な脱分極は、可能性として存在するトルサード・デ・ポワント不整脈の細胞機構である(Surawicz, 1989)。この仮説は、カリウムチャンネルの薬理学的遮断がヒトおよび動物モデルにおけるQT延長および再分極に関連する不整脈を誘導し得るという知見によって支持されている(AntzelevitchおよびSicouri, 1994)。1の形態のLQ

Tが心臓カリウムチャネル遺伝子中の突然変異から生じるという発見は、筋細胞仮説を支持している。

#### 【0010】

理論的に、心臓ナトリウムチャネル遺伝子中の突然変異はLQTを引起し得るであろう。電位依存性ナトリウムチャネルは心室筋細胞における迅速な脱分極を媒介し、活動電位のプラトー相の間に微小電流も伝導する(Attwellら, 1979)。ナトリウムチャネル機能の微小な異常(例えば、ナトリウムチャネル不活化延長またはチャネル不活化の変化した電位依存性)は心臓再分極を延長し、QT延長および不整脈に通じ得る。1992年に、Gellensおよび共同研究者は、心臓ナトリウムチャネル遺伝子、SCN5Aをクローン化し特徴付けした(Gellensら, 1992)。この遺伝子の構造は以前に特徴付けられた他のナトリウムチャネルに類似し、2016アミノ酸の大きなタンパク質をコードしている。これらのチャネルタンパク質は4の相同ドメイン(DI-DIV)を含み、その各々には6の推定される膜に広がる(spanning)セグメント(S1-S6)が含まれる。SCN5Aは染色体3q21にマッピングされており、LQT3の最も有力な候補遺伝子となり(Georgeら, 1995)、その後この遺伝子はLQT3と関連することが証明された(Wangら, 1995)。

10

#### 【0011】

1994年に、WarmkeおよびGanetzkyは新規なヒトcDNA、ヒトether-a-go-go関連遺伝子を同定した(HERG、WarmkeおよびGanetzky, 1994)。HERGは体細胞ハイブリッド・パネルのPCR分析によってヒト第7染色体に位置決定され(WarmkeおよびGanetzky, 1994)、LQT2の候補となっている。カリウムチャネルに対するアミノ酸配列ホモロジーが予想されている。HERGは、カルシウム調節カリウムチャネルをコードするキイロショウジョウバエ(Drosophila)のether-a-go-go遺伝子(eag)に対するホモロジーによって海馬cDNAライブラリーから単離された(Bruggemannら, 1993)。HERGはeagのヒト相同物ではないが、~50%のアミノ酸配列ホモロジーしか共有していない。HERGはLQT2と関連することが示されている(Curránら, 1995)。

20

#### 【0012】

LQT1は、遺伝子KVLQT1と連鎖することが見出されている(Q. Wangら, 1996)。KVLQT1中に突然変異を有する16の家族が同定され、特徴付けられ、16すべての家族においてLQT1とKVLQT1との間に完全な連鎖が存在することが示された。KVLQT1は選書抗体11p15.5にマッピングされ、LQT1の候補遺伝子となっている。KVLQT1はカリウムチャネルの構造特徴を有するタンパク質をコードし、ノザンプロット分析によって測定したこの遺伝子の発現は、KVLQT1は心臓で最も強く発現していることを示した。LQTを引起す1の遺伝子内の欠失および10の異なるミスセンス突然変異がKVLQT1中に同定された。これらのデータは、KVLQT1が新規な心臓カリウムチャネル遺伝子であることを明確にし、この遺伝子中の突然変異が心室不整頻搏および突然死に対する感受性を引起すことを示している。

30

#### 【0013】

$I_{Ks}$ チャネルの1のコンポーネントがminK、単一の推定貫膜ドメインを有する130アミノ酸のタンパク質であることが知られていた(Takumiら, 1988; GoldsteinおよびMiller, 1991; Hausdorffら, 1991; Takumiら, 1991; Buschら, 1992; WangおよびGoldstein, 1995; KW Wangら, 1996)。このタンパク質のサイズおよび構造は、minKが単独で機能性チャネルを形成するのではなさそうなものとしている(Attaliら, 1993; Lesageら, 1993)。KVLQT1およびminKが共同会合して心臓 $I_{Ks}$ カリウムチャネルを形成する事実が示された(Sanguinetiら, 1996)。 $I_{Ks}$ 機能不全は心臓不整脈の原因である。KCNE1中の突然変異(minKをコードする)もLQTを生じることが後に示された(Splaw

40

50

s k i ら , 1 9 9 7 b ) 。

【 0 0 1 4 】

発明の概要

本発明は、薬物誘導型トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動と関連付けられた S C N 5 A 中の 1 の突然変異に指向される。

本発明の 1 の態様において、S C N 5 A 中の特定の突然変異とトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動との関連を提供する。

【 0 0 1 5 】

本発明の第 2 の態様において、薬物誘導型トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に感受性の対象を早期に診断するための S C N 5 A 遺伝子の解析を提供する。当該診断法には、試験すべき個人の S C N 5 A の D N A 配列を解析し、ついで天然の非変異型遺伝子の D N A 配列とそれを比較することが含まれる。薬物誘導型トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対する素因を予想する能力により、医師は、適当な薬物療法を指示することによって感受性患者におけるこれらの症状を予防することが可能となるであろう。

10

【 0 0 1 6 】

本発明は、個人を薬物誘導型トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に罹りやすくする S C N 5 A 突然変異を有する個人におけるトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を治療または予防するのに使用し得る薬剤候補をスクリーニングする方法にも指向される。本発明のもう 1 の態様は、薬剤を S C N 5 A 中に突然変異を有する個人に投与した場合にトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動の発生を生じるかを判定する該薬剤のスクリーニング方法である。

20

【 0 0 1 7 】

発明の詳細な説明

本発明は、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に患者を罹りやすくするであろう S C N 5 A 中の特定の突然変異を患者が有するかを判定することに指向される。さらに、本発明は、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を引起こすこの S C N 5 A 遺伝子変異型の存在についてヒトをスクリーニングする方法に指向される。ここでは、この罹りやすさはより早期（すなわち、病徴が現れる前に）かつより明確に検出し得るため、突然変異を有すると同定された個人について、より良好な治療選択肢が利用可能であろう。本発明は、トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を治療または予防するのに有用な薬剤をスクリーニングする方法にも指向される。

30

【 0 0 1 8 】

本発明は、特定の突然変異を同定するための S C N 5 A 遺伝子をスクリーニングする方法を提供する。さらに、かかる方法は、S C N 5 A 遺伝子の一部分を増幅する工程を含み得、さらに、該 S C N 5 A の一部分を増幅するためのプライマーである 1 セットのポリヌクレオチドを得る工程を含み得る。当該方法は、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対する素因の診断または予測のいずれかに使用するための突然変異を同定するのに有用である。

【 0 0 1 9 】

さらに、本発明は、トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を治療または予防するのに有用な薬剤を同定するための薬剤候補をスクリーニングする方法に指向される。薬剤スクリーニングは、卵母細胞、哺乳動物細胞またはトランスジェニック動物のごとき細胞中で突然変異 S C N 5 A を発現させ、ついで S C N 5 A ナトリウムチャネルに対する薬剤候補の効果をアッセイすることによって行う。その効果を野生型 S C N 5 A ナトリウムチャネル活性と比較する。

40

【 0 0 2 0 】

さらに、本発明は、突然変異 S C N 5 A を有する個人に特定の薬剤を投与した場合に当該個人にトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動が生じるかを判定する薬剤をスクリーニングする方法にも指向される。

【 0 0 2 1 】

50

最後に、本発明は、化合物が突然変異 S C N 5 A タンパク質の活性を調節し得るかを判定するために当該化合物を試験する方法に指向される。

【 0 0 2 2 】

Q T 延長症候群は、心臓不整脈、具体的にはトルサード・デ・ポワントおよび心室細動により突然死を引起す遺伝性または後天性の疾患である。L Q T は以前に 4 の遺伝子座：染色体 1 1 p 1 5 . 5 上の K V L Q T 1、7 q 3 5 - 3 6 上の S C N 5 A、3 p 2 1 - 2 4 上の S C N 5 A および染色体 2 1 q 2 2 . 1 - 2 2 . 2 上の K C N E 1、にマッピングされた。

【 0 0 2 3 】

S C N 5 A 遺伝子中の変化は、N a <sup>+</sup> チャネルの多くの身体的特徴における変化を生じ得る。これらには、限定されるものではないが、イオン特異性、不活化の長さ、電流の大きさ、活性化または不活化の電位依存性、動態力学、活性化するための電位閾値が含まれる。先行技術は、変化した S C N 5 A の存在の結果として変化した活性を有する種々の身体的特徴を教示している。これらの変化の幾つかを論じている刊行物には、V e l d k a m p ら ( 2 0 0 0 )、K a m b o u r i s ら ( 2 0 0 0 )、D e s c h e n e s ら ( 2 0 0 0 )、R o o k ら ( 1 9 9 9 )、A n t z e l e v i t c h ら ( 1 9 9 9 )、C o u d e r c ら ( 1 9 9 9 ) および W a n g ら ( 1 9 9 6 ) が含まれる。これらの身体的特徴は調節し得る。例えば、それらを測定可能な量で、ある種の薬剤での治療によって増大または低下し得る。突然変異 S C N 5 A チャネルを調節するであろう薬剤についてスクリーニングすることが望ましい。大部分の症例においては、突然変異 S C N 5 A チャネルがより野生型 S C N 5 A チャネルのように振る舞い、ゲノムが突然変異 S C N 5 A を含み、これらの薬剤で治療されるべき個人に有利な効果を生じるであろうように、突然変異 S C N 5 A チャネルを調節することが望ましいであろう。ある種の薬剤の不存在下では野生型 S C N 5 A チャネルと比較した場合に活性において何ら検出可能な差異を有していない突然変異 S C N 5 A チャネルの場合においては、野生型 S C N 5 A チャネルと比較した場合に突然変異 S C N 5 A チャネルの活性を調節しないであろう薬剤を見出すための突然変異 S C N 5 A の使用が望ましいであろう。

10

20

【 0 0 2 4 】

本発明の診断および予測方法によれば、野生型 S C N 5 A 遺伝子の変化が検出される。加えて、当該方法は、野生型 S C N 5 A 遺伝子を検出し、この遺伝子座の結果としての薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワントおよび心室細動の欠如を確認することによって行い得る。

30

【 0 0 2 5 】

有用な診断技術には、限定されるものではないが、後に詳細に論じる蛍光イン・サイチュ ( i n s i t u ) ハイブリダイゼーション ( F I S H )、直接 D N A 配列決定、P F G E 解析、サザンブロット解析、一本鎖立体構造解析 ( S S C A )、R N アーゼ保護アッセイ、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド ( A S O )、ドットブロット解析および P C R - S S C P が含まれる。また、D N A マイクロチップ技術の最近開発された技術も有用である。

【 0 0 2 6 】

ヒトを薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワントおよび心室細動に罹りやすくする S C N 5 A 突然変異の存在は、S C N 5 A 遺伝子の突然変異についてヒトのいずれかの組織を試験することによって確認し得る。例えば、生殖細胞系に S C N 5 A 突然変異を遺伝している個人は薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワントおよび心室細動に罹りやすいであろう。このことは、個人の身体のいずれかの組織からの D N A を試験することによって判定し得る。最も単純には、採血し、かかる血液の細胞から D N A を抽出し得る。加えて、出生前診断は、S C N 5 A 遺伝子の突然変異について胎児細胞、胎盤細胞または羊膜細胞を試験することによって行い得る。野生型 S C N 5 A 対立遺伝子の変化は、本明細書中に論じるいずれかの手段によって検出し得る。

40

【 0 0 2 7 】

50

DNA配列変異型を検出するために用い得る幾つかの方法が存在する。手動配列決定または自動化蛍光配列決定かのいずれかの直接DNA配列決定により、配列変異を検出し得る。もう1つのアプローチは、一本鎖DNA立体構造多型アッセイ(SSCP)(Oritara, 1989)である。この方法は全ての配列変化を検出せず、特にDNAフラグメントのサイズが200bpよりも大きい場合には検出せず、最適化して大部分のDNA配列変異を検出し得る。検出感度の低下は不利であるが、SSCPを用いて可能である処理量の増大は、研究ベースの突然変異検出について直接配列決定を魅力的な、価値ある別法としている。ついで、SSCPゲル上でシフトした移動度を有するフラグメントを配列決定して、DNA配列変異の正確な性質を決定する。2の相補的DNA鎖間の誤対合の検出に基づく他のアプローチには、クランプド変性ゲル電気泳動(clamped denaturing gel electrophoresis)(CDGE)(Sheffieldら, 1991)、ヘテロデュプレックス解析(heteroduplex analysis)(HA)(Whiteら, 1992)および化学的誤対合切断(chemical mismatch cleavage)(CMC)(Grompeら, 1989)が含まれる。DNA配列変異を検出する現在利用可能な方法のレビューは、Grompe(1993)による最近のレビューに見出し得る。突然変異が分かたら、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)ハイブリダイゼーションのごとき対立遺伝子特異的な検出アプローチを利用して、同一突然変異について多数の他の試料を迅速にスクリーニングし得る。かかる技術は、金ナノ粒子で標識したプローブを利用して、目に見える色彩結果を得ることができる(Elghaniら, 1997)。突然変異を検出するためのほかの技術は当該技術分野で知られており、使用することができる。例えば、米国特許第5,846,710号、第6,004,744号、第5,888,819号および第5,856,092号に記載されている単一塩基伸長法を使用して単一の塩基の同一性を決定し、その場所が突然変異しているかを判定し得る。

10

20

#### 【0028】

点突然変異の検出は、SCN5A対立遺伝子を分子クローニングし、当該技術分野でよく知られている技術を用いて該対立遺伝子を配列決定することによって行い得る。また、遺伝子または遺伝子の一部分は、例えばPCRまたは他の増幅技術によって増幅し、増幅した遺伝子または増幅した遺伝子の一部分を配列決定し得る。

#### 【0029】

感受性対立遺伝子の存在を確認するためのより完全な、しかしなお間接的な試験のための6のよく知られた方法が存在する：1)一本鎖立体構造解析(SSCP)(Oritara, 1989)；2)変性グラジエントゲル電気泳動(DGGE)(Wartellら, 1990；Sheffieldら, 1989)；3)RNアーゼ保護アッセイ(Finkelsteinら, 1990；Kinszlerら, 1991)；4)対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASOs)(Connerら, 1983)；5)イー・コリ(E.coli)mutSタンパク質のごとき、ヌクレオチド誤対合を認識するタンパク質の使用(Modrich, 1991)；および6)対立遺伝子特異的PCR(RuanoおよびKidd, 1989)。対立遺伝子特異的PCRについては、特定のSCN5A突然変異に3'末端でハイブリダイズするプライマーを用いる。特定の突然変異が存在しない場合には、増幅産物は観察されない。欧州特許出願公開番号0332435号およびNewtonら, 1989に開示されているごとき、増幅耐性突然変異系(Amplification Refractory Mutation System)(ARMS)も用い得る。遺伝子の挿入および欠失は、クローニング、配列決定および増幅によっても検出し得る。加えて、遺伝子または周辺のマーカー遺伝子用の制限断片長多型(RFLP)プローブを用いて、対立遺伝子の変化または多型フラグメント中の挿入を評価し得る。かかる方法は罹った個人に見出される突然変異の存在について、その個人の親族をスクリーニングするのに特に有用である。当該技術分野で知られている挿入および欠失を検出するための他の技術を用い得る。

30

40

#### 【0030】

50

最初の3の方法（SSCP、DGGEおよびRNアーゼ保護アッセイ）においては、新たな電気泳動バンドが現れる。配列変化が一本鎖、分子内塩基ペアリング中に相違を発生するため、SSCPは異なって移動するバンドを検出する。RNアーゼ保護には、突然変異ポリヌクレオチドの2またはそれを超えるより小さなフラグメントへの切断が含まれる。DGGEは、変性グラジエントゲルを用いて、野生型配列と比較した突然変異配列の移動速度における相違を検出する。対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドアッセイにおいては、特定の配列を検出するオリゴヌクレオチドを設計し、アッセイはハイブリダイゼーション・シグナルの有無を検出することによって行う。mutSアッセイにおいては、突然変異配列と野生型配列との間のヘテロデュプレックス中にヌクレオチド誤対合が含まれる配列にのみ該タンパク質が結合する。

10

#### 【0031】

本発明によれば、誤対合とは、2の鎖が100%相補的ではないハイブリダイズした核酸デュプレックスである。全体ホモロジーの欠如は、欠失、挿入、逆位または置換に起因し得る。誤対合検出を用いて、遺伝子中またはそのmRNA産物中の点突然変異を検出し得る。これらの技術は配列決定よりも感度が低い、それらは多数の試料に対して行うのにより単純である。誤対合切断技術の一例は、RNアーゼ保護法である。本発明の実施において、該方法はヒト野生型SCN5A遺伝子コード配列に相補的である標識リボプローブの使用を含む。リボプローブと個人から単離したmRNAまたはDNAのいずれかとを一緒にアニーリング（ハイブリダイズ）させ、その後デュプレックスRNA構造中の幾つかの誤対合を検出することができる酵素RNアーゼAで消化する。RNアーゼAによって誤対合が検出された場合には、それが誤対合の部位を切断する。したがって、アニーリングしたRNA調製物が電気泳動ゲルマトリックス上で分離された場合に、誤対合が検出され、RNアーゼAによって切断されている場合には、リボプローブおよびmRNAまたはDNAについての完全長デュプレックスRNAよりも小さなRNA産物が見られるであろう。リボプローブはmRNAまたは遺伝子の完全長である必要はなく、いずれかのセグメントとし得る。

20

#### 【0032】

同様にして、酵素または化学的切断を介して、DNAプローブを用いて誤対合を検出し得る。例えば、Cottonら、1988；Shenkら、1975；Novackら、1986を参照されたい。別法として、誤対合は、対合デュプレックスに対する誤対合デュプレックスの電気泳動移動度におけるシフトによっても検出し得る。例えば、Carrielloら、1988を参照されたい。リボプローブまたはDNAプローブのいずれかを用いれば、突然変異を含み得る細胞性mRNAまたはDNAをハイブリダイゼーションの前にPCRを用いて増幅し得る（後記を参照されたい）。SCN5A遺伝子のDNA中の変化は、サザンハイブリダイゼーションを用いても検出し得る。

30

#### 【0033】

PCRを使用することによって増幅したSCN5A遺伝子のDNA配列は、対立遺伝子特異的プローブを用いてもスクリーニングし得る。これらのプローブは、その各々が公知の突然変異を収容している遺伝子配列の領域を含む核酸オリゴマーである。例えば、1のオリゴマーは、遺伝子配列の一部に対応する、約30ヌクレオチド長とし得る。一連のかかる対立遺伝子特異的プローブの使用により、PCR増副産物をスクリーニングして、遺伝子中の以前に同定された突然変異の存在を同定し得る。増幅したSCN5A配列と対立遺伝子特異的プローブとのハイブリダイゼーションは、例えば、ナイロン・フィルター上で行い得る。高ストリンジェンシー・ハイブリダイゼーション条件下における特定のプローブに対するハイブリダイゼーションは、対立遺伝子特異的プローブ中と同一の突然変異が組織中に存在することを示している。

40

#### 【0034】

マイクロチップ技術を紹介する新たに開発された核酸解析の技術も、本発明に適用可能である。この技術においては、逐語的に、何千もの異なるオリゴヌクレオチド・プローブをシリコン・チップ上にアレイで構築する。分析すべき核酸を蛍光標識し、チップ上のプロー

50

ブにハイブリダイズさせる。また、これらの核酸マイクロチップを用いて核酸 - タンパク質相互作用を研究することも可能である。この技術を用いれば、突然変異の存在を判定しもしくは解析すべき核酸を配列決定することさえでき、あるいは関心の遺伝子の発現レベルを測定することができる。当該方法は、多くの、数千さえのプロープの同時の平行プロセシングのうちの1つであって、解析速度をおびただしく増大し得る。この技術を用いる幾つかの論文が発表されている。これらのうちの幾つかは、H a c i a ら, 1996; S h o e m a k e r ら, 1996; C h e e ら, 1996; L o c k h a r t ら, 1996; D e R i s i ら, 1996; L i p s h u t z ら, 1995である。この方法は、乳ガン遺伝子B R C A 1中の突然変異につき人々をスクリーニングするためにすでに用いられている(H a c i a ら, 1996)。この新たな技術は、C h e m i c a l a n d E n g i n e e r i n g N e w s 中のnew a r t i c l e (B o r m a n, 1996)にレビューされており、論説の主題になっている(Editorial, N a t u r e G e n e t i c s, 1996)。F o d o r (1997)も参照されたい。

10

#### 【0035】

候補遺伝子座中の突然変異についての最も完成した試験は、患者からのゲノムS C N 5 A配列と対照集団からのものとを直接比較することである。別法として、例えばP C Rによって増幅した後にメッセンジャーR N Aを配列決定し得、それによって候補遺伝子のエキソン構造を決定する必要性がなくなる。

#### 【0036】

野生型遺伝子の変化は、野生型S C N 5 Aタンパク質の変化をスクリーニングすることによっても検出し得る。例えば、S C N 5 Aと免疫反応性のモノクローナル抗体を用いて組織をスクリーニングし得る。血族抗原の欠如は突然変異を示すであろう。突然変異対立遺伝子の産物に特異的な抗体を用いて、突然変異遺伝子産物を検出することもできるであろう。かかる免疫アッセイは、当該技術分野で知られているいずれの簡便な形式でも行い得る。これらには、ウエスタン・ブロット、免疫組織化学アッセイおよびE L I S A アッセイが含まれる。変化したS C N 5 Aタンパク質を検出するいずれかの手段を用いて、野生型S C N 5 A遺伝子の変化を検出し得る。タンパク質結合性判定のごとき機能性アッセイを用い得る。加えて、S C N 5 Aの生化学的機能を検出するアッセイを用い得る。

20

#### 【0037】

突然変異S C N 5 A遺伝子または遺伝子産物は、血清、便、尿および唾液のごとき他のヒト身体試料中にも検出し得る。組織中の突然変異遺伝子または遺伝子産物を検出するための前記で論じたものと同じ技術は、他の身体試料にも適用し得る。かかる身体試料をスクリーニングすることによって、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対する素因について単純な早期診断を達成し得る。

30

#### 【0038】

本発明のプライマー・ペアは、P C Rを用いる特定のS C N 5 A対立遺伝子のヌクレオチド配列を決定するのに有用である。S C N 5 Aに対する一本鎖D N Aプライマーのペアは、遺伝子自体の増幅D N A合成を開始するために、S C N 5 A遺伝子の中またはそれを取り囲む配列にアニーリングし得る。対立遺伝子特異的プライマーも用い得る。かかるプライマーは特定のS C N 5 A突然変異対立遺伝子にのみアニーリングし、したがって、鋳型としての突然変異対立遺伝子の存在下でのみ産物を増幅するのである。

40

#### 【0039】

野生型S C N 5 A遺伝子を有する個人が薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に罹りやすくないことが知られている。しかしながら、S C N 5 A遺伝子産物の機能を妨害する特異的突然変異が薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対する素因に関与していることを本明細書中に示す。したがって、機能損失または変化した機能を有するタンパク質を産生する変化した(または突然変異)S C N 5 A遺伝子の存在は、トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対する素因を直接的に引き起こす。S C N 5 A遺伝子突然変異を検出するために、生物試料を調製し、分析すべき対立遺伝子の配列と野生型対立遺伝子の配列との間の相異につき分析する。突然変異S C N 5 A対立遺伝

50

子は、前記した技術のいずれかによって最初に同定し得る。ついで、突然変異対立遺伝子を配列決定して、特定の突然変異対立遺伝子の特定の突然変異を同定する。別法として、突然変異対立遺伝子は、慣用技術を用いて、突然変異（変化した）タンパク質を同定することによって最初に同定し得る。ついで、突然変異対立遺伝子を配列決定して、各対立遺伝子についての特定の突然変異を同定する。ついで、突然変異を、本発明の診断および予測法に用いる。

#### 【0040】

##### 定義

本発明は以下の定義を用いる。

“ポリヌクレオチドの増幅”は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、連結増幅（またはリガーゼ連鎖反応、LCR）およびQ-ベータレプリカーゼの使用に基づく増幅方法のごとき方法を利用する。また、鎖置換増幅（SDA）、好熱性SDA、および核酸配列ベース増幅（3SRまたはNASBA）も有用である。これらの方法は当該技術分野でよく知られており、広く実施されている。例えば、（PCRについては）米国特許第4,683,195号および第4,683,202号；（LCRについては）WuおよびWallace, 1989；（SDAについては）米国特許第5,270,184号および第5,455,166号ならびにWalkerら, 1992；（好熱性SDAについては）Spargoら, 1996、ならびに3SRおよびNASBAについては米国特許第5,409,818号、Fahyら, 1991およびCompton, 1991を参照されたい。PCRを行うための試薬およびハードウェアは市販されている。SCN5A領域からの配列を増幅するのに有用なプライマーは、好ましくはSCN5A領域中またはその中の標的領域に近接する領域中の配列に相補的であって、特異的にハイブリダイズする。増幅によって生成したSCN5A配列は直接的に配列決定し得る。別法として、あまり望ましくないが、増幅した配列（群）は配列分析の前にクローン化し得る。酵素的に増幅したゲノム・セグメントの直接クローニングおよび配列分析方法は、Scharfら, 1986によって記載されている。

#### 【0041】

“分析物ポリヌクレオチド”および“分析物鎖”とは、標的配列を含有すると予想される一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドをいい、生物試料を含む種々のタイプの試料中に存在し得る。

“抗体” 本発明は、SCN5AポリペプチドおよびそのフラグメントまたはSCN5A領域からのポリヌクレオチド配列に特異的に結合することができる、ポリクローナル抗体および/またはモノクローナル抗体ならびにそれらのフラグメント、ならびにそれらの免疫学的結合等価物をも提供する。“抗体”なる語は、均一な分子基、または複数の異なる分子基から構成される血清生成物のごとき混合物の双方をいうために用いる。ポリペプチドは、ペプチド合成機で合成的に調製し、担体分子（例えば、キーホール・カサガイ・ヘモシアニン）にカップリングし、数ヶ月にわたりウサギに注射し得る。ウサギ血清は、SCN5Aポリペプチドまたはフラグメントに対する免疫反応性について試験する。モノクローナル抗体は、タンパク質ポリペプチド、融合タンパク質またはそれらのフラグメントでマウスを注射することによって生成し得る。モノクローナル抗体は、ELISAによってスクリーニングし、SCN5Aポリペプチドまたはそのフラグメントとの特異的免疫反応性について試験されるであろう。HarlowおよびLane, 1988を参照されたい。これらの抗体は、アッセイならびに医薬において有用であろう。

#### 【0042】

十分量の目的のポリペプチドを得たら、それを種々の目的に用い得る。典型的な用途は、結合性につき特異的な抗体の生成である。これらの抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルのいずれかとし得、当該技術分野でよく知られているイン・ビトロ（*in vitro*）またはイン・ビボ（*in vivo*）技術によって生成し得る。ポリクローナル抗体の生成については、適当な標的免疫系、典型的にはマウスまたはウサギを選択する。実質的に精製した抗原は、動物に適した方法および免疫学者によく知られた他のパラメー

10

20

30

40

50

タによって決定した様式で免疫系に提示する。注射用の典型的な部位は、フットパッド中、筋肉内、腹膜内または皮内的である。もちろん、マウスまたはウサギを他の種に置き換え得る。ついで、目的の特異性に調整した、ポリクローナル抗体を当該技術分野で知られている技術を用いて精製する。

#### 【0043】

免疫学的応答は、通常、免疫アッセイを用いてアッセイする。普通、かかる免疫アッセイには、例えば同一細胞によって生成されるおよび抗原として同一の様式で生成される抗原の起源の幾分かの精製が含まれる。種々の免疫アッセイ法が当該技術分野でよく知られている。例えば、HarlowおよびLane, 1988またはGoding, 1986を参照されたい。

10

#### 【0044】

$10^{-8}$  M<sup>-1</sup>、または好ましくは $10^{-9}$ ないし $10^{-10}$  M<sup>-1</sup>またはより強力なアフィニティーを有するモノクローナル抗体は、典型的には、HarlowおよびLane, 1988またはGoding, 1986に記載されている標準的な手法によって生成されるであろう。簡単には、適当な動物を選択し、目的の免疫化プロトコルがそれに続く。適当な期間の後に、かかる動物の脾臓を取出し、適当な選抜条件下にて、個々の脾臓細胞を典型的には不死化ミエローマ細胞に融合させる。その後、細胞をクローン的に分離し、各クローンの上清を抗原の目的の領域に特異的な適当な抗体のその生成について試験する。

#### 【0045】

他の好適な技術には、抗原性ポリペプチドに対するリンパ球のイン・ビトロ (in vitro) 暴露、または別法として、ファージまたは同様なベクター中の抗体のライブラリーの選抜に対するリンパ球のイン・ビトロ暴露が含まれる。Huseら, 1989を参照されたい。本発明のポリペプチドおよび抗体は修飾するかまたはしないで用い得る。頻繁には、ポリペプチドおよび抗体は、共有的または非共有的に、検出可能なシグナルを供する物質に結合することによって標識するであろう。広範な種々の標識およびコンジュゲート技術が知られており、科学文献および特許文献の双方に多数報告されている。好適な標識には、放射性核種、酵素、基質、補助因子、インヒビター、蛍光剤、化学ルミネセンス剤、マグネティック粒子等が含まれる。かかる標識の使用を教示する特許には、米国特許第3,817,837号;第3,850,752号;第3,939,350号;第3,996,345号;第4,277,437号;第4,275,149号および第4,366,241号が含まれる。また、組換え免疫グロブリンも生成し得る(米国特許第4,816,567号を参照されたい)。

20

30

#### 【0046】

“結合パートナー”とは、高い特異性でリガンド分子を結合することができる分子をいい、例えば、抗原と抗原-特異的な抗体または酵素とそのインヒビターのごときである。一般的に、特異的結合パートナーは、単離条件下にて分析物コピーノ(ポリヌクレオチド・ハイブリダイゼーションの場合においては)相補鎖デュプレックスを不動化させるのに十分なアフィニティーで結合しなければならない。特異的な結合パートナーは当該技術分野で知られており、例えば、ビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジン、IgGおよびプロテインA、膨大な公知のレセプター-リガンド結合物ならびに相補的ポリヌクレオチド鎖が含まれる。相補的ポリヌクレオチド結合パートナーの場合においては、パートナーは通常少なくとも約15塩基長であって少なくとも40塩基長とし得る。15塩基よりも短い長さ(例えば、8塩基)、15ないし40塩基、および40塩基よりも長いものも用い得ることは当業者によってよく認識される。ポリヌクレオチドは、DNA、RNAまたは合成ヌクレオチド・アナログより構成し得る。さらなる結合パートナーは、例えば本明細書中に記載するとき2-ハイブリッド酵母スクリーニング・アッセイを用いて同定し得る。

40

#### 【0047】

“生物試料”とは、個人からの分析物ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含有すると

50

予想される組織または流体の試料をいい、限定されるものではないが、例えば血漿、血清、髄液、リンパ液、皮膚の表面切片、呼吸管、消化管および尿生殖器管、涙、唾液、血液細胞、ガン、器官、組織およびイン・ビトロ (in vitro) 細胞培養構成物の試料が含まれる。

【0048】

“コードする” ポリヌクレオチドは、その天然の状態で、または当業者によく知られている方法によって操作した場合に、それが転写および/または翻訳されてmRNAおよび/もしくはポリペプチドまたはそれらのフラグメントを生成し得る場合には、ポリペプチドを“コードする”という。アンチセンス鎖はかかる核酸の相補体であって、コード配列はそれから推定可能である。

10

“単離した”または“実質的に純粋な” “単離した”または“実質的に純粋な”核酸（例えば、RNA、DNAまたは混合ポリマー）とは、天然のヒト配列またはタンパク質、例えばリボソーム、ポリメラーゼ、多くの他のヒトゲノム配列およびタンパク質を自然に伴う他の細胞コンポーネントから実質的に分離されたものである。この語は、その天然に発生した環境から取り出された核酸配列またはタンパク質を包含し、組換えまたはクローン化DNA単離体ならびに化学合成アナログまたは不均一系によって生物学的に合成したアナログが含まれる。

【0049】

“SCN5A対立遺伝子”とは、SCN5A遺伝子座の正常な対立遺伝子ならびに薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を引起す変異を運搬しているSCN5Aの対立遺伝子をいう。

20

【0050】

“SCN5A遺伝子座”、“SCN5A遺伝子”、“SCN5A核酸”または“SCN5Aポリヌクレオチド”とは、各々、その全てが正常な組織中で発現されているようであり、SCN5A領域中に存在し、そのある種の対立遺伝子が薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を生じる、ポリヌクレオチドをいう。SCN5A遺伝子座は、コード配列、介在配列、ならびに転写および/または翻訳を制御する調節エレメントを含むことが意図される。SCN5A遺伝子座はDNA配列の全対立遺伝子変異を含むことが意図される。

【0051】

これらの用語は、核酸に適用する場合には、例えばタンパク質融合物または欠失を含む、ヒトSCN5Aのポリペプチド、フラグメント、ホモログまたは変異型をコードする核酸をいう。本発明の核酸は、天然SCN5A-コード遺伝子に由来するかまたはそれと実質的に類似するかのいずれかである配列、または天然SCN5A-コード遺伝子またはその一部分と実質的なホモロジーを有する配列を所有するであろう。

30

【0052】

SCN5A遺伝子または核酸には、SCN5Aポリヌクレオチドのアミノ酸配列に対して効果を有しないサイレント対立遺伝子を含むSCN5A遺伝子の正常な対立遺伝子、ならびにその機能に実質的に影響しないSCN5Aポリペプチドのアミノ酸配列変異型に通じる対立遺伝子が含まれる。これらの用語は、SCN5Aポリペプチドの機能に悪影響する1またはそれを超える突然変異を有する対立遺伝子も含む。突然変異は、SCN5A機能の部分的または完全な消失を生じる、SCN5Aポリペプチドのアミノ酸配列中に有害な変化を生成するSCN5A核酸配列中の変化、または効果的なSCN5A発現の消失もしくは異常な形態のSCN5Aポリペプチドの生成を生じる核酸配列中の変化となり得る。

40

【0053】

SCN5A核酸は配列番号：1（野生型）または配列番号：3（突然変異体）に示すものとし得、それは薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に罹りやすい特定の特前変異を含み得る。

【0054】

50

本発明による核酸は、配列番号：1および3に示す配列とは異なる配列を含み得、なお、配列番号：2および4に示すのと同じのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし得る。すなわち、本発明の核酸には、遺伝コードの結果として縮重となる配列が含まれる。

【0055】

SCN5A遺伝子は、(a)(i)高ストリンジェントな条件下(Ausubelら, 1992)で配列番号：1または配列番号：3に記載のアミノ酸配列をコードするDNA配列の相補体にハイブリダイズする、および(ii)配列番号：2または配列番号：4に機能的に等価である遺伝子産物をコードする、いずれのDNA配列、あるいは(b)(i)中度にストリンジェントな条件のごとき(Ausubelら, 1992)、より低くストリンジェントな条件下で配列番号：2または配列番号：4に記載のアミノ酸配列のうちの1をコードするDNA配列の相補体にハイブリダイズする、および(ii)配列番号：2または4によって示されるSCN5Aに機能的に等価である遺伝子産物をコードする、いずれのDNA配列をもいう。

10

【0056】

本発明のポリヌクレオチド組成物には、RNA、cDNA、ゲノムDNA、合形成、ならびにセンスおよびアンチセンス鎖の双方の混合ポリマーが含まれ、当業者により容易に理解されるごとく、化学的または生化学的に修飾し得、あるいは非-天然または誘導化ヌクレオチド塩基を含み得る。かかる修飾には、例えば、標識、メチル化、アナログでの1またはそれを超える天然に発生するヌクレオチドの置換、非電荷結合(例えば、ホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、カルバメート他)、電荷結合(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート他)、ペンダント基(例えば、ポリペプチド)、インターカレーター(例えば、アクリジン、ソラレン他)、キレート剤、アルキル剤、および修飾結合(例えば、アルファ-アノマー核酸他)のごときヌクレオチド間修飾が含まれる。また、水素結合およびその他の化学的相互作用を介して設計した配列に結合するその能力においてポリヌクレオチドを模倣する合成分子も含まれる。かかる分子は当該技術分野で知られており、例えば、その中で分子の骨格中のリン酸結合の代わりにペプチド結合が用いられているものが含まれる。

20

【0057】

本発明は、SCN5A領域の全部または一部分を含む組換え核酸を提供する。組換え構築物は宿主細胞で自律的に複製することができる。別法として、組換え構築物は、宿主細胞の染色体DNAに組み込まれ得る。かかる組換えポリヌクレオチドには、その起源または操作によって、1)天然ではそれと関連するポリヌクレオチドの全部または一部分と関連しない；2)天然ではそれに結合するもの以外のポリヌクレオチドに結合する；または3)天然では発生しない、ゲノム、cDNA、半合成または合成起源のポリヌクレオチドが含まれる。本発明による核酸がRNAを含む場合には、示した配列に参照して、Tに代えてUを用いて、RNA等価物を参照すると解釈しなければならない。

30

【0058】

したがって、天然に発生しない他の配列を含む組換え核酸が本発明によって提供される。野生型配列も用い得るが、それはしばしば、例えば欠失、置換または挿入によって変化するであろう。種々のタイプのcDNAまたはゲノミック・ライブラリーは、本発明の核酸の天然起源としてスクリーニングし得、あるいはかかる核酸はゲノムDNAまたは他の天然起源に内在する配列の、例えばPCRによる増幅によって提供され得る。cDNAライブラリーの選択は、通常、目的タンパク質のmRNAに富む組織起源に対応する。ファージ・ライブラリーが普通は好ましいが、他のタイプのライブラリーも用い得る。ライブラリーのクローンをプレート上にひろげ、スクリーニング用の基体に移し、変性させ、ついで目的の配列の存在について釣上げる。

40

【0059】

本発明において用いるDNA配列は、通常、少なくとも約5コドン(15ヌクレオチド)、より通常には少なくとも約7-15コドン、および最も好ましくは、少なくとも約35コドンを含むであろう。1またはそれを超えるイントロンも存在し得る。このヌクレオチ

50

ドの数は、通常、SCN5Aをコードする配列と特異的にハイブリダイズするであろう首尾よいプローブに必要なほぼ最小限の長さである。この文章において、8ヌクレオチドほど短いオリゴマー、より一般的には8 - 17ヌクレオチドを、とりわけチップ技術と連結して、プローブに使用し得る。

#### 【0060】

核酸操作の技術は、例えば、Sambrookら、1989またはAusubelら、1992に一般的に記載されている。制限酵素等のごとき、かかる技術を適用するのに有用な試薬は当該技術分野で広く知られており、New England Biolabs社、Boehringer Mannheim社、Amersham社、Promega社、U.S. Biochemicals社、New England Nuclear社のごとき業者および多数の他の供給源から市販されている。本発明の融合タンパク質を生成するために用いる組換え核酸配列は、天然または合成配列由来とし得る。多くの天然遺伝子配列が、適当なプローブを用いて種々のcDNAからまたはゲノミック・ライブラリーから入手可能である。GenBank, National Institutes of Healthを参照されたい。

10

#### 【0061】

本明細書中で用いる場合、SCN5Aの遺伝子座または領域または対立遺伝子の“一部分”は、少なくとも約8ヌクレオチド、または好ましくは約15ヌクレオチド、またはより好ましくは少なくとも約25ヌクレオチドの最小限サイズを有すると定義され、少なくとも約40ヌクレオチドの最小限サイズを有し得る。この定義には、8 - 40ヌクレオチドの範囲の全てのサイズならびに40ヌクレオチドを超えるものが含まれる。したがって、この定義には、8、12、15、20、25、40、60、80、100、200、300、400、500ヌクレオチドの核酸、またはこれらの値の範囲内のいずれかの数のヌクレオチド（例えば、9、10、11、16、23、30、38、50、72、121他のヌクレオチド）を有する核酸、または500を超えるヌクレオチドを有する核酸が含まれる。本発明は、配列番号：1または配列番号：3、その相補体または機能的に等価な核酸配列由来の少なくとも8ヌクレオチドを有する全ての新規な核酸を含む。本発明は、先行技術に存在する核酸を含むものではない。すなわち、本発明は、配列番号：1または配列番号：3由来の少なくとも8ヌクレオチドを有する全ての核酸を含むが、但し、先行技術に存在する核酸は含まない。

20

30

#### 【0062】

“SCN5Aタンパク質”または“SCN5Aポリペプチド”とは、SCN5A遺伝子座、変異型またはそれらのフラグメントによってコードされるタンパク質またはポリペプチドをいう。“ポリペプチド”なる語は、アミノ酸およびその等価物のポリマーをいうのであって、特定の長さの生成物をいうものではない；したがって、ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質がポリペプチドの定義の中に含まれる。この語は、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化等のようなポリペプチドの修飾をいうものではなく、あるいはそれを排除する。定義の中に含まれるのは、例えば、（例えば、非天然アミノ酸他を含む）1またはそれを超えるアミノ酸のアナログを含むポリペプチド、置換結合を有するポリペプチドならびに天然および非天然に発生する当該技術分野で公知の他の修飾である。通常、かかるポリペプチドは、天然SCN5A配列に対して少なくとも約50%相同であり、好ましくは約90%を超えて相同であり、より好ましくは少なくとも約95%相同であろう。また、高または低ストリンジェンシー条件下でSCN5Aをコードする核酸にハイブリダイズするDNAによってコードされるタンパク質、ならびにSCN5Aタンパク質に対する抗血清によって回収された関連の高いポリペプチドまたはタンパク質も含まれる。

40

#### 【0063】

SCN5Aポリペプチドは、単離および/または精製形態の、天然には関連する材料を含まないまたは実質的に含まないものとし得る、配列番号：2または配列番号：4に示したものとし得る。ポリペプチドは、原核生物細胞中の発現によって生成するかまたは合成的

50

に生成する場合には、グリコシル化のごとき天然の翻訳後プロセッシングを欠き得る。別法として、本発明は、S C N 5 A ポリペプチドの配列変異型、対立遺伝子または誘導体であるポリペプチドにも指向される。かかるポリペプチドは、1またはそれを超えるアミノ酸の1またはそれを超える付加、置換、欠失または挿入によって、配列番号：2または配列番号：4に記載のものとは異なるアミノ酸配列を有し得る。好ましいかかるポリペプチドはS C N 5 A 機能を有する。

#### 【0064】

置換変異型は、典型的には、タンパク質内の1またはそれを超える部位で1のアミノ酸から他のものへの交換を含み、他の機能または特性を消失することなく、タンパク質加水分解切断に対する安定性のごとき、1またはそれを超えるポリペプチドの特性を調節するように設計し得る。アミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、および/または両親媒的性質における類似性に基づいて作成し得る。好ましい置換は、保存的、すなわち1のアミノ酸を同様な形態および電荷のもので置換えたものである。保存的置換は当該技術分野でよく知られており、典型的には、以下のグループ内の置換が含まれる：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リシン、アルギニン；およびチロシン、フェニルアラニン。

#### 【0065】

ある種のアミノ酸は、例えば、抗体の抗原結合領域または基質分子上の結合部位もしくはS C N 5 A ポリペプチドと相互作用するタンパク質上の結合部位のごとき、構造との相互作用結合能力のかなりの消失なしに、タンパク質構造中で他のアミノ酸に置換し得る。タンパク質の生物学的機能活性を決めるのはタンパク質の相互作用能力および性質であるため、ある種のアミノ酸置換をタンパク質配列およびその基礎をなすD N A コード配列中に作成し得、それにもかかわらず、同様な特性を有するタンパク質を得ることができる。かかる変化を作成することにおいて、アミノ酸のハイドロパシー・インデックスを考慮し得る。タンパク質に相互作用的生物機能を付与することにおける疎水性アミノ酸インデックスの重要性は、一般的に当該技術分野で理解されている（K y t e および D o o l i t t l e , 1 9 8 2 ）。別法として、アミノ酸のようなものの置換は、親水性に基づいて効果的に作成し得る。タンパク質の相互作用的生物機能を付与することにおける親水性の重要性は、一般的に当該技術分野で理解されている（米国特許第4,554,101号）。ポリペプチドを設計することにおいて疎水性インデックスまたは親水性を用いることは、米国特許第5,691,198号にさらに論じられている。

#### 【0066】

ホモロジーについて比較したポリペプチド配列の長さは、一般的に、少なくとも約16アミノ酸、通常、少なくとも約20残基、より通常には少なくとも約24残基、典型には少なくとも約28残基、および好ましくは約35を超える残基であろう。

“作動可能に結合した”とは、かく記載したコンポーネントがその意図する様式で機能することを許容する関係で存在する並びをいう。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響する場合、該プロモーターはコード配列に作動可能に結合している。

#### 【0067】

ペプチド模倣物または模倣物なる語は、S C N 5 A ポリペプチドの本質的な生物活性を有する物質をいうことを意図する。ペプチド模倣物は、タンパク質二次構造のエレメントを模倣するペプチド含有分子とし得る（J o h n s o n ら , 1 9 9 3 ）。ペプチド模倣物の使用の背後に存在する根本的理由は、主として、タンパク質のペプチド骨格が、抗体と抗原、酵素と基質または足場タンパク質のもののごとき、分子相互作用を促進するように、アミノ酸側鎖を方向付けるために存在することである。ペプチド模倣物は、天然分子と同様な分子相互作用を許容するように設計される。模倣物は、必ずしもペプチドでなくてもよいが、それは天然S C N 5 A ポリペプチドの本質的な生物活性を保持しているであろう。

#### 【0068】

10

20

30

40

50

“プローブ” トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動へ罹りやすくするSCN5A対立遺伝子と関連するポリヌクレオチド多型は、ストリンジェントないし中度にストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で、標的配列のポリヌクレオチドと安定なハイブリッドを形成するポリヌクレオチド・プローブとのハイブリダイゼーションによって検出される。プローブが標的配列に対して完全に相補的であろうと予想される場合には、高ストリンジェンシー条件を用いるであろう。幾つかの誤対合が予想される場合、例えば、プローブが完全に相補的ではないであろうという結果でもって変異型が予想される場合には、ハイブリダイゼーション・ストリンジェンシーを低下させ得る。非特異的/偶然の結合を除外、すなわちノイズを最小限化する条件を選択する。(本明細書全体を通して、“ストリンジェントな”条件を用いると単純に述べられている場合には、“高ストリンジェンシー”条件を用いたと読むことを意味する)。かかる指摘は中性DNA多型性ならびに突然変異を同定するため、これらの指摘は、SCN5A感受性対立遺伝子の検出を示すためにさらなる分析を必要とする。

10

#### 【0069】

SCN5A対立遺伝子用のプローブは、SCN5A領域の配列、そのcDNA、機能的等価配列、またはそれらの相補体由来とし得る。プローブは、SCN5A領域の全体または一部分にひろがるいずれの好適な長さのものであってもよく、それは領域に対する特異的なハイブリダイゼーションを許容する。標的配列がプローブのものと同一の配列を含む場合には、ハイブリッドはストリンジェント条件下でさえ比較的安定であろうため、プローブを例えば8 - 30塩基対の範囲の短いものとし得る。ある程度の誤対合がプローブと予想される場合、すなわち、プローブが変異型領域にハイブリダイズするであろうと予想される場合には、必要な特異性で標的配列にハイブリダイズするより長いプローブを用い得る。

20

#### 【0070】

プローブは、標識またはレポーター分子に結合した単離ポリヌクレオチドを含み、標準的な方法によって配列類似性を有する他のポリヌクレオチド配列を単離するために用い得る。プローブを調製および標識する技術については、例えばSambrookら, 1989またはAusubelら, 1992を参照されたい。他の同様なポリヌクレオチドは、相同ポリヌクレオチドを用いることによって選択し得る。別法として、これらまたは同様なポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、遺伝子コードの縮重を使用することによって合成または選択し得る。種々のコドン置換を、例えばサイレント変化(それによって、種々の制限部位を生成する)によって導入し、あるいは特定の系に対する発現を最適化し得る。突然変異を導入して、ポリペプチドの特性を修飾し、おそらくポリペプチドの分解または代謝速度を変化させ得る。

30

#### 【0071】

本発明の合成オリゴヌクレオチドまたは他のポリヌクレオチドを含むプローブは、天然発生または組換え一本鎖もしくは二本鎖ポリヌクレオチド由来とし得、あるいは化学合成し得る。プローブは、ニック・トランスレーション、クレノウ・フィル・イン反応、または当該技術分野で知られている他の方法によっても標識し得る。

#### 【0072】

SCN5Aをコードするポリヌクレオチド配列からの、少なくとも約8ヌクレオチド、通常少なくとも約15ヌクレオチドを有し、かつ約9kbよりも小さい、通常約1.0kbよりも小さいポリヌクレオチド配列の部分が、プローブとして好ましい。したがって、この定義には、8、12、15、20、25、40、60、80、100、200、300、400または500ヌクレオチドのプローブ、またはこれらの値の範囲内のいずれかの数(例えば、9、10、11、16、23、30、38、50、72、121他のヌクレオチド)のヌクレオチドを有するプローブ、あるいは500を超えるヌクレオチドを有するプローブが含まれる。該プローブを用いて、SCN5AをコードするmRNAが細胞または組織中に存在するかを判定することもできる。先行技術に存在するプローブを含まない。すなわち、本発明は、配列番号: 1または配列番号: 3由来の少なくとも8のヌクレ

40

50

オチドを有する全てのプローブを含むが、但し、それには先行技術に存在するプローブは含まれない。

【0073】

同様な考察およびヌクレオチド長は、SCN5A遺伝子の全体または一部分の増幅に用い得るプライマーにも適用し得る。したがって、プライマーについての定義には、8、12、15、20、25、40、60、80、100、200、300、400、500ヌクレオチドのプライマー、またはこれらの値の範囲内のいずれかの数のヌクレオチド（例えば、9、10、11、16、23、30、38、50、72、121他のヌクレオチド）を有するプライマー、あるいは500を超えるヌクレオチド、あるいは500ないし9000のいずれかの数のヌクレオチドを有するプライマーが含まれる。このプライマーを用いて、SCN5AをコードするmRNAが細胞または組織中に存在するか否かを判定することもできる。本発明は、SCN5A遺伝子を増幅するための、SCN5A遺伝子座由来の少なくとも8のヌクレオチドを有する全ての新規なプライマー、その相補体または機能的に等価な核酸配列が含まれる。本発明は、先行技術に存在するプライマーを含むものではない。すなわち、本発明は、少なくとも8ヌクレオチドを有する全てのプライマーを含むが、但し、先行技術に存在するプライマーは含まない。

10

【0074】

“タンパク質修飾またはフラグメント”は、一次構造配列に実質的に相同であるが、例えば、イン・ビボ(in vivo)またはイン・ビトロ(in vitro)の化学および生化学修飾を含むかまたは異常なアミノ酸を取入れた、SCN5Aポリペプチドまたはそのフラグメントに関する本発明によって供される。かかる修飾には、例えば、当業者によって容易に認識されるであろう、アセチル化、カルボキシル化、リン酸化、グリコシル化、ユビキチン化、例えば放射性核種での標識ならびに種々の酵素的修飾が含まれる。ポリペプチドを標識する種々の方法およびかかる目的につき有用な種々の置換または標識は当該技術分野でよく知られており、<sup>32</sup>Pのごときラジオアイソトープ、標識化抗リガンドに結合するリガンド（例えば、抗体）、発蛍光団、化学ルミネセンス剤、酵素、ならびに標識リガンドに対する特異的結合ペア・メンバーとして作用し得る抗リガンドが含まれる。標識の選択は、必要な感度、プライマーとのコンジュゲーションの容易性、安定性要件、および入手可能な機器に依存する。ポリペプチドを標識する方法は当該技術分野でよく知られている。Sambrookら、1989またはAusubelら、1992を参照されたい。

20

30

【0075】

実質的に完全長のポリペプチドに加えて、本発明は、ポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントを提供する。重要な生物活性には、SCN5Aポリペプチドに特徴的な、リガンド結合性、免疫学的活性および他の生物活性が含まれる。免疫学的活性には、標的免疫系における免疫学的機能、ならびにSCN5Aタンパク質のエピトープに対する競合物(competitor)または置換抗原のいずれかとして作用する、結合するための免疫学的エピトープの共有性の双方が含まれる。本明細書中で用いる“エピトープ”とは、ポリペプチドの抗原決定基をいう。エピトープには、エピトープにユニークな空間立体構造で3のアミノ酸が含まれ得る。一般的に、エピトープは、少なくとも5のかかるアミノ酸、およびより通常には、少なくとも8-10のかかるアミノ酸からなる。かかるアミノ酸の空間立体構造を決定する方法は、当該技術分野で知られている。

40

【0076】

免疫学的目的のため、タンデム・リピート・ポリペプチド・セグメントを免疫原として用い、それによって非常に抗原性の高いタンパク質を作成し得る。別法として、かかるポリペプチドは特異的結合についての非常に効率的な競合物として作用するであろう。SCN5Aポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体の生成を以下に記載する。

【0077】

本発明は、SCN5Aポリペプチドおよびフラグメントを含む融合ポリペプチドをも提供

50

する。相同ポリペプチドは、2またはそれを超える S C N 5 A ポリペプチド配列間または S C N 5 A と関連タンパク質との配列の間の融合物とし得る。同様にして、誘導タンパク質の特性または活性の組合せを示すであろう異種融合物を構築し得る。例えば、リガンド-結合性のまたは他のドメインは、異なる新たな融合ポリペプチドまたはフラグメント間で“交換”し得る。かかる相同または異種の融合ポリペプチドは、例えば、変化した強さまたは特異性の結合性を示し得る。融合パートナーには、免疫グロブリン、細菌  $\beta$ -ガラクトシダーゼ、trpE、プロテインA、 $\beta$ -ラクタマーゼ、アルファ・アミラーゼ、アルコール・デヒドロゲナーゼおよび酵母アルファ接合因子が含まれる。Godowskiら, 1988を参照されたい。

#### 【0078】

融合タンパク質は、典型的には、下記するときいずれかの組換え核酸法によって作成し得、あるいは化学合成し得る。ポリペプチドを合成する技術は、例えばMerrifield, 1963に記載されている。

#### 【0079】

“タンパク質精製”とは、S C N 5 A をコードする組換え核酸で形質転換した細胞からのごとき、他の生物材料から S C N 5 A ポリペプチドを単離するための種々の方法をいい、当該技術分野でよく知られている。例えば、かかるポリペプチドは、例えば本発明によって提供される抗体、を用いた免疫アフィニティー・クロマトグラフィーによって精製し得る。タンパク質精製の種々の方法は当該技術分野でよく知られており、Deutscher, 1990およびScopes, 1982に記載されているものが含まれる。

#### 【0080】

“単離された”、“実質的に純粋な”および“実質的に均一な”なる語は、その天然の状態でそれに付随するコンポーネントから分離されたタンパク質またはポリペプチドを説明するために相互交換的に用いる。モノメリック(monomeric)タンパク質は、少なくとも約60ないし75%の試料が単一のポリペプチド配列を示す場合は実質的に純粋である。実質的に純粋なタンパク質は、典型的には、約60ないし90%W/Wのタンパク質試料、より通常には約95%を超えて、および好ましくは約99%を超えて純粋であろう。タンパク質の純度または均一度は、タンパク質試料のポリアクリルアミドゲル電気泳動につづくゲル染色時の単一のポリペプチド・バンドの視覚化のごとき、当該技術分野でよく知られている多数の方法によって示し得る。特定の目的のため、より高い分解能を、精製に用いられている当該技術分野でよく知られているHPLCまたは他の方法を用いることによって得ることができる。

#### 【0081】

S C N 5 A タンパク質は、その天然状態でそれに付随する天然の夾雑物からそれを分離した場合には、天然に関連するコンポーネントを実質的に含まない。したがって、化学合成したか、またはそれからそれが天然に生じる細胞とは異なる細胞系で合成したポリペプチドは、その天然に関連するコンポーネントを実質的に含まないであろう。タンパク質は、当該技術分野でよく知られているタンパク質精製技術を用いて、単離することによって天然に関連するコンポーネントを実質的に含まないものとし得る。

単離し、操作した遺伝子配列の発現産物として産生されるポリペプチドは、相同細胞型中で発現させた場合でさえ、本明細書中で用いるとき“単離されたポリペプチド”である。合成的に作成した形態または異種細胞によって発現された分子は、本来的に単離分子である。

#### 【0082】

“組換え核酸”とは、天然に発生しない、または配列の2の他の分離したセグメントの人工的組合せによって生成した核酸である。この人工的組み合わせは、しばしば、化学合成法、または例えば遺伝子工学技術による核酸の単離セグメントの人工的な操作のいずれかによって行う。かかるものは、通常、コドン、同一または保存的アミノ酸をコードする縮重コドンで置換えるために行われ、一方、典型的には配列認識部位を導入するかまたは除去する。別法として、目的の機能の核酸セグメントと一緒に結合して、目的の機能組み

10

20

30

40

50

合わせを生成するためにもそれを行う。

#### 【0083】

“調節配列”とは、普通は遺伝子座のコード配列の100bp内の配列をいうが、それはコード領域からより遠くに離れていることもあり、それは（遺伝子の転写、およびメッセンジャーRNAの翻訳、スプライシング、安定性等を含む）遺伝子の発現に影響する。

“実質的ホモロジーまたは類似性” 他の核酸（またはその相補鎖）と（適当なヌクレオチドの挿入または欠失を有して）最適に並べた場合に、ヌクレオチド塩基の少なくとも約60%、通常は少なくとも約70%、より通常には少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約90%、およびより好ましくは少なくとも約95-98%のヌクレオチド塩基にヌクレオチド配列の同一性が存在する場合には、核酸またはそのフラグメントは、もう10  
のものに“実質的に相同である”（“または実質的に類似である”）。

#### 【0084】

2の異なる核酸の間のホモロジーを決定するためには、BLASTNプログラム“BLAST 2 sequences”を用いて%ホモロジーを決定する。このプログラムは、インターネット上でNational Center for Biotechnology Information (NCBI) から公共用途で入手可能である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>) (Altschulら, 1997)。用いるべきパラメーターは、括弧内のデフォルト・パラメーターで、以下のどの組み合わせが最高の算出%ホモロジーを与えるかである：

#### 【0085】

プログラム - blastn

マトリックス - BLOSUM62

対合に対するリワード - 0 または 1 (1)

誤対合に対するペナルティー - 0, -1, -2 または -3 (-2)

オープンギャップ・ペナルティー - 0, 1, 2, 3, 4 or 5 (5)

伸長ギャップ・ペナルティー - 0 または 1 (1)

ギャップ x\_ドロップオフ - 0 または 50 (50)

予測 - 10

#### 【0086】

種々の他の結果と一緒に、このプログラムは完全鎖を横切る (across) または対合する2の核酸の領域を横切る%同一性を示す。プログラムは、比較する2の鎖のアライメントおよび同一性を結果の一部として示す。鎖が同じ長さのものである場合には、同一性は核酸の完全長を横切って計算されるであろう。鎖が等しくない長さのものである場合には、短い方の核酸の長さを用いるべきである。核酸がそれらの配列の部分を全く同様に横切るがそれらの配列の残りを異なって横切る場合には、blastnプログラム“BLAST 2 Sequences”は類似部分のみを横切る同一性を示し、これらの部分は別個に報告される。本明細書中のホモロジーを決定する目的について、%ホモロジーとは比較する2の配列のうちの短い方をいう。いずれか1の領域が異なる%同一性で異なるアライメントで示される場合には、最高のホモロジーを与えるアライメントを用いるべきである。平均化は、配列番号：5および6のこの例におけるごとく行う。 30  
40

#### 【0087】

##### 【化1】

5'-ACCGTAGCTACGTACGTATATAGAAAGGGCGCGATCGTCGTCGCGTATGACGAC  
TTAGCATGC-3' (配列番号：5)

5'-ACCGGTAGCTACGTACGTTATTTAGAAAGGGGTGTGTGTGTGTGTGTAAACCGGG  
GTTTTTCGGGATCGTCCGTCGCGTATGACGACTTAGCCATGCACGGTATATCGTAT  
TAGGACTAGCGATTGACTAG-3' (配列番号：6)

#### 【0088】

プログラム“BLAST 2 Sequences”は、選択したパラメータに依存してこれら2の核酸の異なるアライメントを示す。例えば、配列番号：5および6を比較するために4セットのパラメータを選択し（ギャップ×\_\_ドロップオフは全ケースにつき50とした）、結果を表1に示す。表1に示すごとく選択したパラメータのセットのいずれもが、必ずしもこれらの配列を比較するためのパラメータの最良のセットであるとは限らないことは注意すべきである。%ホモロジーは、同一性を示す各領域につき、領域内の短い方の鎖の塩基のフラクションとその領域についての%同一性を乗じ、これら全てを一緒に加算することによって算出される。例えば、表1に示す第1セットのパラメータを用いれば、配列番号：5が短い方の配列（63塩基）であり、同一性の2の領域が示される。第1のものは配列番号：6に対して92%同一性を有する配列番号：5の塩基4-29（26塩基）を含み、第2のものは配列番号：6に対して100%同一性を有する配列番号：5の塩基39-59（21塩基）を含む。塩基1-3、30-38および60-63（16塩基）は、配列番号：6といずれかの同一性を有すると示されていない。%ホモロジーは： $(26/63)(92) + (21/63)(100) + (16/63)(0) = 71.3\%$ ホモロジーとして算出される。示した各4セットのパラメータを用いて算出したホモロジーの%を表1に掲載する。他の幾つかのパラメータの組み合わせも可能であるが、それらは簡潔性のために掲載しない。各セットのパラメータが異なる算出%ホモロジーとなることが示されている。最高%ホモロジーを与える結果を用いるべきであるため、ただこれら4セットのパラメータに基づいて、配列番号：5および6は87.1%のホモロジーを有するというであろう。再度、他のパラメータを用いれば配列番号：5および6についてのより高いホモロジーを示し得るが、簡潔性のため、全ての可能な結果は示さない。

10

20

【0089】

【表1】

表 1

| パラメータ値 |     |              |            | 同一の領域 (%)                 |                              | ホモロジー |
|--------|-----|--------------|------------|---------------------------|------------------------------|-------|
| 対合     | 誤対合 | オープン<br>ギャップ | 伸長<br>ギャップ |                           |                              |       |
| 1      | -2  | 5            | 1          | 5の4-29および<br>6の5-31 (92%) | 5の39-59および<br>6の71-91 (100%) | 71.3  |
| 1      | -2  | 2            | 1          | 5の4-29および<br>6の5-31 (92%) | 5の33-63および<br>6の64-96 (93%)  | 83.7  |
| 1      | -1  | 5            | 1          | -----                     | 5の30-59および<br>6の61-91 (93%)  | 44.3  |
| 1      | -1  | 2            | 1          | 5の4-29および<br>6の5-31 (92%) | 5の30-63および<br>6の61-96 (91%)  | 87.1  |

30

40

【0090】

別法として、選択的ハイブリダイゼーション条件下で、核酸またはそのフラグメントがもう1の核酸（またはその相補鎖）にハイブリダイズするであろう場合には、鎖またはその

50

相補体に対する実質的なホモロジーまたは（類似性）が存在する。特異性の全体的欠如よりも実質的により選択的であるハイブリダイゼーションが起こる場合には、ハイブリダイゼーションの選択性が存在する。典型的には、少なくとも約14ヌクレオチドのストレッチにわたって、少なくとも約55%、好ましくは少なくとも約65%、より好ましくは少なくとも約75%、および最も好ましくは少なくとも約90%のホモロジーが存在する場合には、選択的ハイブリダイゼーションが生じるであろう。Kanehisa, 1984を参照されたい。ホモロジー比較の長さは、記載したごとく、より長いストレッチにわたるとし得、ある種の具体例においては、少なくとも約9ヌクレオチド、通常には少なくとも約20ヌクレオチド、より通常には少なくとも約24ヌクレオチド、典型的には少なくとも約28ヌクレオチド、より典型的には少なくとも約32ヌクレオチド、および好ましくは少なくとも約36またはそれを超えるヌクレオチドのストレッチにわたるものとしばし得よう。

10

#### 【0091】

核酸ハイブリダイゼーションは、当業者によって容易に理解されるごとく、塩基の組成、相補鎖の長さ、およびハイブリダイズした核酸間のヌクレオチド塩基誤対合の数に加えて、塩濃度、温度、または有機溶媒のごとき条件によって影響されるであろう。ストリンジェントな温度条件には、一般的に、30℃を超える、典型的には37℃を超える、および好ましくは45℃を超える温度が含まれるであろう。ストリンジェントな塩濃度は、普通には1000mMより低い、典型的には500mMより低い、および好ましくは200mMより低いものである。しかしながら、パラメータの組み合わせは、いずれの単一のパラメータの測定よりも遥かに重要である。ストリンジェンシー条件は、核酸の長さおよび核酸の塩基組成に依存し、当該技術分野でよく知られている技術によって決定し得る。例えば、WetmurおよびDavidson, 1968を参照されたい。

20

#### 【0092】

プローブ配列も、ある種の条件下でデュプレックスDNAに特異的にハイブリダイズして、トリプレックスまたは他のより高次元のDNA複合体を形成し得る。かかるプローブの調製および好適なハイブリダイゼーション条件は当該技術分野でよく知られている。

#### 【0093】

“実質的なホモロジー”または“実質的に同一”なる語は、ポリペプチドについていう場合には、問題のポリペプチドまたはタンパク質が全体的に天然に発生するタンパク質またはその一部分と、少なくとも約30%同一、通常には少なくとも約70%同一、より通常には少なくとも約80%同一、好ましくは少なくとも約90%同一、およびより好ましくは少なくとも約95%同一を示すことを示す。ポリペプチドに関するホモロジーは、典型的には、配列解析ソフトウェアを用いて測定する。例えば、Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 910 University Avenue, Madison, Wisconsin 53705のSequence Analysis Software Packageを参照されたい。タンパク質解析ソフトウェアは、種々の置換、欠失および他の修飾にあてたホモロジーの測定を用いて類似配列をマッチさせる。保守的置換には、典型的には、以下のグループの置換が含まれる：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リシン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。

30

40

#### 【0094】

“実質的に同様な機能”とは、野生型SCN5A核酸または野生型SCN5Aポリペプチドに参照した、修飾核酸または修飾タンパク質の機能をいう。修飾ポリペプチドは、野生型SCN5Aポリペプチドに対して実質的に相同であって、実質的に同一の機能を有するであろう。修飾ポリペプチドは変化したアミノ酸配列を有し得、かつ/または修飾アミノ酸を含み得る。機能の同様性に加えて、修飾ポリペプチドは、より長い半減期のごとき他の有用な特性を有し得る。修飾ポリペプチドの機能（活性）の同様性は、野生型SCN5Aポリペプチドの活性と実質的に同一となり得る。別法として、修飾ポリペプチドの機能

50

(活性)の同様性は、野生型 S C N 5 A ポリペプチドの活性よりもより高いものとなり得る。修飾ポリペプチドは、慣用技術を用いて合成するか、あるいは修飾核酸によってコードさせて、慣用技術を用いて産生させる。修飾核酸は慣用技術によって調製する。野生型 S C N 5 A 遺伝子機能と実質的に同様な機能を有する核酸は、前記した修飾タンパク質を産生する。

#### 【0095】

ポリペプチドの“フラグメント”、“一部分”または“セグメント”とは、少なくとも約5ないし7の隣接アミノ酸、しばしば少なくとも約7ないし9の隣接アミノ酸、典型的には少なくとも約9ないし13の隣接アミノ酸、および最も好ましくは、少なくとも約20ないし30またはそれを超える隣接アミノ酸のアミノ酸残基のストレッチである。

10

#### 【0096】

本発明のポリペプチドは、可溶性である場合には、固相支持体、例えばニトロセルロース、ナイロン、カラム充填材(例えば、セファロース(Sephacrose)ビーズ)、マグネティック・ビーズ、ガラスウール、プラスチック、金属、ポリマーゲル、細胞または他の基体にカップリングさせ得る。かかる支持体は、例えば、ビーズ、ウェル、ディップスティックまたはメンブレンの形態をとり得る。

#### 【0097】

“標的領域”とは、増幅および/または検出する核酸の領域をいう。“標的配列”なる語は、所望の条件下でそれとプローブまたはプライマーが安定なハイブリッドを形成するであろう配列をいう。

20

本発明の実施は、別段指摘しない限り、化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA、遺伝学および免疫学の慣用技術を用いる。例えば、Maniatisら, 1982; Sambrookら, 1989; Ausubelら, 1992; Glover, 1985; Anand, 1992; GuthrieおよびFink, 1991を参照されたい。ヒト第1染色体のマッピングを含むヒト遺伝子マッピング用の技術および材料の一般的議論は、例えばWhiteおよびLalouel, 1988に提供されている。

#### 【0098】

組換えまたは化学合成核酸の調製; ベクター、形質転換、宿主細胞

大量の本発明のポリヌクレオチドは、好適な宿主細胞中の複製によって産生し得る。目的フラグメントをコードする天然または合成ポリヌクレオチド・フラグメントは、原核生物または真核生物細胞に導入し、そこで複製することができる、組換えポリヌクレオチド構築物、通常はDNA構築物に取り込ませる。通常、ポリヌクレオチド構築物は、酵母または細菌のごとき単細胞宿主中の複製に好適であろうが、(ゲノム内へ組込ませるか組込ませないで)培養哺乳動物もしくは植物または他の真核生物セルラインへの導入も意図し得る。本発明の方法によって作製した核酸の精製は、例えば、Sambrookら, 1989またはAusubelら, 1992に記載されている。

30

#### 【0099】

本発明のポリヌクレオチドは、例えばBeaucageおよびCaruthers, 1981によって記載されているホスホルアミダイト法またはMatteucciおよびCaruthers, 1981によるトリエステル法による化学合成によって生成することもでき、市販の自動化オリゴヌクレオチド合成機で行い得る。二本鎖フラグメントは、相補鎖を合成し、適当な条件下で該鎖を共にアニーリングさせるか、または適当なプライマー配列とDNAポリメラーゼを用いて相補鎖を付加するかのいずれかによって、化学合成の一本鎖生成物から得ることができる。

40

#### 【0100】

原核生物または真核生物宿主に導入するために調製したポリヌクレオチド構築物は、目的ポリペプチドをコードする意図するポリヌクレオチド・フラグメントを含み、および、好ましくはポリペプチドをコードするセグメントに作動可能に結合した転写および翻訳開始調節配列も含むであろう、宿主によって認識される複製系を含み得る。発現ベクターは、例えば、複製起点または自律複製配列(ARS)ならびに発現制御配列、プロモーター、

50

エンハンサー、およびリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、転写ターミネーター配列およびmRNA安定化配列のごとき必要なプロセッシング情報部位を含み得る。かかるベクターは、当該技術分野でよく知られており、例えば、Sambrookら、1989またはAusubelら、1992に論じられている標準的な組換え技術によって調製し得る。

#### 【0101】

適当なベクターおよび他の必要なベクター配列は、宿主中で機能するように選択され、適当な場合には、SCN5A遺伝子と天然に関連するものを含み得る。セルラインと発現ベクターとの作動可能な組合せの例は、Sambrookら、1989またはAusubelら、1992に記載されており；またMetzgerら、1988も参照されたい。多くの有用なベクターが当該技術分野で知られており、Stratagene社、New England Biolabs社、Promega Biotech社等のごとき業者から得ることができる。trp、lacおよびファージ・プロモーター、tRNAプロモーターおよび解糖酵素プロモーターのごときプロモーターを原核生物宿主で用い得る。有用な酵母プロモーターには、メタロチオネイン、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたはエノラーゼもしくはグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ、マルトースおよびガラクトース利用に寄与する酵素他のごとき他の解糖酵素のプロモーター領域が含まれる。酵母発現において使用するのに好適なベクターおよびプロモーターは、Hitzenmanら、EP 73, 675 Aにさらに記載されている。適当な非-天然哺乳動物プロモーターには、SV40からの初期および後期プロモーター(Fiersら、1978)またはモロニー白血病ウイルス、マウス腫瘍ウイルス、ニワトリ肉腫ウイルス、アデノウイルスII、ウシ乳頭腫ウイルスまたはポリオーマ由来のプロモーターが含まれ得る。昆虫プロモーターは、バキュロウイルス由来とし得る。加えて、構築物は、遺伝子の複数コピーを生成し得るように、増幅性遺伝子(例えば、DHFR)に結合し得る。適当なエンハンサーおよび他の発現制御配列に関しては、Enhancers and Eukaryotic Gene Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1983)も参照されたい。また、例えば、米国特許第5, 691, 198号；第5, 735, 500号；第5, 747, 469号および第5, 436, 146号も参照されたい。

#### 【0102】

かかる発現ベクターは自律的に複製し得るが、それらは当該技術分野でよく知られている方法によって、宿主細胞のゲノムに挿入することによっても複製し得る。発現およびクロニングベクターは、選択マーカー、ベクターで形質転換した宿主細胞の生存または増殖に必要なタンパク質をコードする遺伝子をおそらく含むであろう。この遺伝子の存在は、インサートを発現する宿主細胞のみの増殖を保証する。典型的な選択遺伝子は、a) 抗生物質または他の毒性物質、例えばアンピシリン、ネオマシン、メトトレキサート他に対する抵抗性を付与する、b) 栄養要求性欠損を補う、またはc) 複合培地から利用できない必須栄養素を供給する(例えば、BacilliについてはD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子)、タンパク質をコードする。適当な選択マーカーの選択は宿主細胞に依存し、異なる宿主に対する適当なマーカーは当該技術分野でよく知られている。

#### 【0103】

注目する核酸を含有するベクターはイン・ビトロ(in vitro)で転写し、得られたRNAをよく知られている方法、例えばインジェクション(Kubora、1988を参照されたい)によって宿主細胞に導入し、あるいはベクターは、エレクトロポレーション；塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランまたは他の物質を用いるトランスフェクション；マイクロプロジェクティル・ボンバード法；リポフェクション；インフェクション(ベクターがレトロウイルス・ゲノムのごとき感染性因子である場合)；ならびに他の方法を含む、細胞宿主のタイプに依存して変化する、当該技術分野でよく知られている方法によって宿主細胞に直接的に導入し得る。一般的には

、Sambrookら、1989およびAusubelら、1992を参照されたい。とりわけ前記したものを含む当該技術分野で知られているいずれかの方法によってポリヌクレオチドを宿主細胞に導入することを、本明細書中で“形質転換”という。前記した核酸が導入された細胞は、かかる細胞の子孫をも含むことを意味する。

#### 【0104】

大量の本発明の核酸およびポリヌクレオチドは、和合性の原核生物または真核生物宿主細胞において、ベクターまたは他の発現担体中でSCN5A核酸またはその一部分を発現させることによって調製し得る。バチルス・ズブチルス(Bacillus subtilis)またはシュードモナス(Pseudomonas)のごとき他の原核生物も用い得るが、最も一般的に用いられる原核生物宿主はエスシェリキア・コリ(Escherichia coli)の菌株である。 10

#### 【0105】

哺乳動物、あるいは酵母、糸状菌、植物、昆虫または両生類もしくは鳥類種のごとき他の真核生物宿主細胞も、本発明のタンパク質の産生に有用となり得る。培養における哺乳動物細胞の繁殖はそれ自体よく知られている。JakobyおよびPastan(編)、1979を参照されたい。例えばより高い発現性、望ましいグリコシル化パターンまたは他の特徴を提供するためには他のセルラインが適当となり得ることは熟練実務者によって理解されるが、一般的に用いられる哺乳動物セルラインの例はVEROおよびHEL細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ならびにWI38、BHKおよびCOSセルラインである。一般的に用いられる昆虫セルラインの例はSF9である。 20

#### 【0106】

クローンは、ベクター構築のモードに依存するマーカーを用いることによって選抜する。マーカーは同一または異なるDNA分子、好ましくは同一DNA分子上に存在し得る。原核生物宿主においては、形質転換体は、例えばアンピシリン、テトラサイクリンまたは他の抗生物質に対する抵抗性によって、選択し得る。温度感受性に基づく特定の生成物の産生も適当なマーカーとして作用し得る。

#### 【0107】

本発明のポリヌクレオチドで形質転換した原核細胞または真核細胞は、本発明の核酸およびポリペプチドの生成のみならず、例えば、SCN5Aポリペプチドの特徴を研究することにおいても有用であろう。 30

本明細書中に開示するSCN5A遺伝子配列に基づくプローブおよびプライマーを用いて、他の種の相同SCN5A遺伝子配列およびタンパク質を同定する。これらの遺伝子配列およびタンパク質は、それらを単離した種についての本明細書中に記載する診断/予測、治療および薬剤スクリーニング法に用いる。

#### 【0108】

使用方法：薬剤スクリーニング

本発明は、形質転換細胞、トランスフェクト卵巣細胞またはトランスジェニック動物にSCN5Aタンパク質を用いることによって化合物をスクリーニングするのに特に有用である。突然変異SCN5Aタンパク質中の突然変異は心臓ナトリウムチャネルの機能を変化し得るため、候補薬剤は、正常SCN5Aタンパク質または突然変異SCN5Aタンパク質のいずれかを含有する細胞を用いたチャネルに対する効果についてスクリーニングする。当該薬剤を培養中の細胞に添加するかまたはトランスジェニック動物に投与し、野生型ナトリウムチャネルの誘導電流に対する作用を突然変異ナトリウムチャネルを含有する細胞または動物の誘導電流に対するものと比較する。誘導電流をより正常なレベルに変化させる薬物候補は、薬剤誘導型のトルサード・デ・ボワンツおよび心室細動を治療または予防するために有用である。同一タイプの実験を行って、薬剤誘導型のトルサード・デ・ボワンツおよび心室細動を治療または予防する能力についてではなく、薬物がトルサード・デ・ボワンツおよび心室細動を誘導し得るものであるかを判愛知することについて、薬剤をスクリーニングする。突然変異SCN5Aを発現する細胞または動物に薬剤を添加すると当該薬剤が存在しない場合の誘導Na<sup>+</sup>電流とは異なる電流を生じる場合、その薬剤は 40 50

、突然変異を有する個人にトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を誘導し得るものである。同様な実験を野生型 S C N 5 A を発現する細胞または動物に対して行い、試験薬剤が野生型の細胞または動物における誘導  $\text{Na}^+$  電流に対して同様な効果を有するかを判定し得る。同様な効果が示された場合には、突然変異 S C N 5 A を有する個人は野生型 S C N 5 A を有する個人よりも高い危険性を有するものとされないが、薬物処理した細胞または動物における誘導電流が非薬物処理細胞または動物細胞からの薬物処理した野生型細胞または動物におけるものよりも大きな量でもって異なる場合には、突然変異を有する個人は薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動の危険性の高い状態にある。

#### 【0109】

本発明は、種々の薬剤スクリーニング技術のいずれかで S C N 5 A ポリペプチドまたはその結合フラグメントを用いることによって化合物をスクリーニングするのに特に有用である。 10

かかる試験に用いる S C N 5 A ポリペプチドまたはフラグメントは、溶液中に遊離しているか、固体支持体に固定化されているか、または細胞表面に結合させるかのいずれかとし得る。薬剤スクリーニングの 1 の方法は、好ましくは競合結合アッセイで、ポリペプチドまたはそのフラグメントを発現している組換えポリヌクレオチドで安定して形質転換した真核生物または原核生物の宿主細胞を用いる。生存可能または固定化形態のかかる細胞は、標準結合アッセイに用い得る。例えば、S C N 5 A ポリペプチドまたはフラグメントと試験する剤との間の複合体の形成を測定し得、または S C N 5 A ポリペプチドまたはフラグメントと公知のリガンドとの間の複合体の形成が試験する剤によって妨害される程度を 20 調べることができる。

#### 【0110】

かくして、本発明は、かかる剤と S C N 5 A ポリペプチドまたはそのフラグメントとを接触させて、当該技術分野でよく知られている方法によって、( i ) 剤と S C N 5 A ポリペプチドまたはフラグメントとの間の複合体の存在について、または ( i i ) S C N 5 A ポリペプチドまたはフラグメントとリガンドとの間の複合体の存在についてアッセイすることを含む薬剤をスクリーニングする方法を提供する。かかる競合結合アッセイにおいては、S C N 5 A ポリペプチドまたはフラグメントは典型的には標識する。遊離 S C N 5 A ポリペプチドまたはフラグメントは、タンパク質：タンパク質複合体で存在するものから分離し、遊離（すなわち非複合体形成）標識の量は、各々、S C N 5 A に対して試験すべき 30 剤の結合性または S C N 5 A : リガンド結合性のその妨害の測定値である。また、遊離よりむしろ、結合した S C N 5 A の量を測定することもできる。また、S C N 5 A よりむしろ、リガンドを標識し、試験すべき薬剤の存在または不存在下で S C N 5 A に結合するリガンドの量を測定することも可能である。

#### 【0111】

薬剤スクリーニングのもう 1 つの技術は、S C N 5 A ポリペプチドに対して好適な結合アフィニティーを有する化合物の高処理量スクリーニングを提供し、G e y s e n ( 国際公開 W O 8 4 / 0 3 5 6 4 ) に詳記されている。簡単に述べると、多数の異なる小ペプチド試験化合物を、プラスチック・ピンまたは他の表面のごとき固体基体上で合成する。ペプチド試験化合物を S C N 5 A ポリペプチドと反応させ、洗浄する。ついで、結合した S 40 C N 5 A ポリペプチドを当該技術分野でよく知られている方法によって検出する。

#### 【0112】

精製 S C N 5 A は、前記した薬剤スクリーニング技術で使用するためのプレート上に直接コートし得る。しかしながら、ポリペプチドに対する非 - 中和抗体を用いて抗体を捕捉して、固相上に S C N 5 A ポリペプチド固定化し得る。

本発明は、S C N 5 A ポリペプチドに特異的に結合することができる中和抗体を、S C N 5 A ポリペプチドまたはそのフラグメントに結合する試験化合物と競合させる競合薬剤スクリーニングアッセイの使用をも考慮している。この様にして、抗体を用いて、S C N 5 A ポリペプチドの 1 またはそれを超える抗原決定基を共有するいずれかのペプチドの存在を検出し得る。 50

## 【0113】

本発明のポリペプチドは、コンビナトリアル・ライブラリー技術の結果として開発された化合物をスクリーニングするのにも用い得る。コンビナトリアル・ライブラリー技術は、潜在的な膨大な数の異なる物質をポリペプチドの活性を調節する能力について膨大な数の異なる物質を試験する有効な方法を提供する1。かかるライブラリーおよびその使用は当該技術分野で知られている。ポリペプチドライブラリーの使用が好ましい。例えば、WO 97/02048号を参照されたい。

## 【0114】

簡単には、ポリペプチドの活性を調節させる物質をスクリーニングする方法には、好適な反応培地中で1またはそれを超える試験物質をポリペプチドと接触させ、処理したポリペプチドの活性を試験し、その活性を試験物質または物質群で処理していない匹敵する反応培地中のポリペプチドの活性と比較することを含み得る。処理ポリペプチドと非処理ポリペプチドとの間の活性の差は、関連試験物質または物質群の調節効果の暗示である。

10

## 【0115】

活性の調節についてスクリーニングする前、ならびにしている間に、試験物質を、例えば、酵母2-ハイブリッド系（例えば、Bartleら、1993；FieldsおよびSong、1989；ChevrayおよびNathans、1992；Leeら、1995）で、ポリペプチドと相互作用する能力についてスクリーニングし得る。この系は、ポリペプチドの活性を調節する実際の能力について物質を試験する前の粗いスクリーニングとして用い得る。別法として、該スクリーニングを用いて、SCN5A特異的結合パートナーへの結合性について試験物質をスクリーニングし、またはSCN5Aポリペプチドの模倣物を見出すことができるであろう。

20

## 【0116】

ポリペプチド活性を調節またはそれに影響する物質を同定した後に、その物質をさらに調べ得る。さらに、それは、調製物、すなわち製造物または処方、あるいは医薬、医薬組成物または薬剤のごとき組成物で製造および/または使用し得る。これらは、個人に投与し得る。

## 【0117】

かくして、本発明は、ポリペプチド活性のモジュレーターとして核酸分子を用いて同定される物質のみならず、本明細書中に開示するものと一致して、かかる物質を含む医薬組成物、医薬、薬剤または他の組成物、かかる物質を含むかかる組成物を投与することを含む方法、かかる組成物を、例えば薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を治療する（予防的治療をも含み得る）ために患者に投与することを含む方法、例えば薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を治療するために、投与する組成物の製造におけるかかる物質の使用、ならびに、かかる物質と医薬上許容される賦形剤、ビヒクルまたは担体、および所望により他の成分とを混合することを含む医薬組成物の製造方法をも包含する種々の態様に及ぶ。

30

## 【0118】

ポリペプチド機能のモジュレーターとして同定した物質は、本来、ペプチドまたは非-ペプチドとし得る。非-ペプチド“小分子”はしばしば多くのイン・ビボ（in vivo）医薬用途に好ましい。したがって、（特に、ペプチドの場合）物質の模倣物または擬似物を医薬用途に設計し得る。

40

## 【0119】

公知の医薬上有効な化合物に対する模倣物の設計は、“リード”化合物に基づく医薬の開発の公知のアプローチである。このことは、有効化合物が合成することが困難であるか高価となる場合、あるいはそれが特定の投与方法に好適でない場合（例えば純粋なペプチドは、それが消化管中のプロテアーゼによって迅速に分解されがちなため口腔組成物に好適でない有効剤である）に、このことは望ましい。模倣物の設計、合成および試験は、一般的に、標的特性について多数の分子をランダムにスクリーニングすることを避けるために用いる。

50

## 【0120】

所定の標的特性を有する化合物から模倣物を設計するために一般的にとられる幾つかの工程が存在する。第1に、標的特性を決定することにおいて極めて重要および/または重要である化合物の特定の部分を決定する。ペプチドの場合においては、このことは、ペプチド中のアミノ酸残基を系統的に変化させることによって、例えば、順次各残基を置換することによって、行い得る。ペプチドのアラニン・スキャンを一般的に用いて、かかるペプチド・モチーフを清澄にする。化合物の活性領域を構成するこれらの部分または残基は、その“ファーマココア”として知られている。

## 【0121】

ファーマココアを見出したら、線源の範囲からのデータ、例えば分光光学的技術、x線回折データおよびNMRを用いてその物理学的特性、例えばステレオケミストリー、結合性、サイズおよび/または電荷、に従ってその構造をモデルする。コンピュータ解析、同様なマッピング(原子間の結合よりもむしろ、ファーマココアの電荷および/または容積をモデルする)および他の技術をこのモデリング工程で用い得る。

## 【0122】

このアプローチの変形において、リガンドとその結合パートナーの三次元構造をモデル化する。これは、リガンドおよび/または結合パートナーが結合の際に立体構造を変化させ、模倣物の設計においてこのことを考慮するモデルを許容する。

## 【0123】

ついで、ファーマココアを擬似する化学基が移植される鋳型分子を選択する。鋳型分子およびそれに移植した化学基は、模倣物が合成しやすく、薬理学的に許容できるようであり、かつイン・ビボ(in vivo)で分解されないが、リード化合物の生物活性は保持するように、慣用的に選択し得る。別法として、模倣物がペプチドに基づく場合には、ペプチドを環化させることによってさらなる安定性を達成し、その剛直性を増大し得る。ついで、このアプローチによって見出された模倣物または模倣物群は、それらが標的特性を有するか否か、またはそれらがそれをどの程度まで示すかを理解するためにスクリーニングし得る。ついで、さらなる最適化または修飾を行って、イン・ビボ(in vivo)または臨床試験用の1またはそれを超える最終模倣物に到達し得る。

## 【0124】

使用方法：核酸診断および診断キット

個人を薬剤誘導型のトルサード・デ・ボワンツおよび心室細動に罹りやすくさせるSCN5A対立遺伝子の存在を検出するために、血液のごとき生物試料を調製し、SCN5Aの感受性対立遺伝子の存在または不存在について分析する。薬剤誘導型のトルサード・デ・ボワンツおよび心室細動に対する素因または予測インジケータとしての存在を検出するために、生物試料を調製し、SCN5Aの突然変異対立遺伝子の存在または不存在について分析した。これらの試験の結果および解釈情報を、試験個人へのコミュニケーションのためにヘルスケア・プロバイダーに返す。かかる診断は、診断研究室によって行い得、あるいは別法として、診断キットを製造し、ヘルスケア・プロバイダーまたは自己診断用に個人に販売し得る。

## 【0125】

最初に、スクリーニング法には、関連SCN5A配列の増幅が含まれる。本発明のもう1つの好ましい態様において、該スクリーニング方法には非-PCRベースの戦略が含まれる。かかるスクリーニング方法には、当該技術分野でよく知られている二段階標識増幅法が含まれる。PCRおよび非-PCRベースのスクリーニング戦略は双方とも、高レベルの感度で標的配列を検出し得る。

## 【0126】

今日用いられている最もなじみ深い方法は標的増幅である。ここでは、標的核酸配列をポリメラーゼを用いて増幅する。ポリメラーゼ-作動増幅を用いる1つの特に好ましい方法は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である。ポリメラーゼ連鎖反応および他のポリメラーゼ-作動増幅アッセイは、ポリメラーゼ-作動増幅サイクルの使用を通してコピー数で

10

20

30

40

50

100万倍を超える増加を達成し得る。増幅したら、得られた核酸を配列決定し、またはDNAプローブ用の基体として用い得る。

#### 【0127】

プローブを用いて標的配列の存在を検出する場合には、血液または血清のごとき分析すべき生物試料を処理し、望むなら、核酸を抽出し得る。試料核酸は種々の方法で調製して、標的配列の検出、例えば変性、制限分解、電気泳動またはドット・プロットングを促進し得る。分析物核酸の標的領域は、通常、少なくとも部分的に一本鎖であって、プローブの標的配列とハイブリッドを形成しなければならない。配列が本来一本鎖である場合には、変性は必要でないであろう。しかしながら、配列が二本鎖である場合には、該配列はおそらく変性させる必要があるであろう。変性は当該技術分野で知られている種々の方法によって行い得る。 10

#### 【0128】

分析物核酸およびプローブは、プローブ中の標的配列と分析物中の推定標的配列との安定なハイブリッド形成を促進する条件下でインキュベートする。分析物に結合させるために用いるプローブの領域は、ヒト第7染色体の標的化領域に完全に相補的にし得る。したがって、偽陽性を予防するためには、高ストリンジェンシー条件が望ましい。しかしながら、高ストリンジェンシー条件は、プローブがゲノムにユニークである染色体の領域に相補的である場合にのみ用いる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、温度、イオン強度、塩基組成、プローブ長、およびホルムアミド濃度を含む、ハイブリダイゼーションの間および洗浄工程の間の多くの因子によって決る。これらの因子は、例えばM a n i a t i s ら, 1982およびS a m b r o o k ら, 1989に概説されている。ある種の環境下においては、トリプレックス、クアドラプレックス他のごとき、より高次のハイブリッドの形成が、標的配列を検出する方法を供するために望ましいこともあり得る。 20

#### 【0129】

いずれにせよ、得られたハイブリッドの検出は、通常、標識プローブを用いることによって行う。別法として、プローブは非標識とし得るが、直接または間接的に標識したリガンドと特異的に結合させることによって検出し得る。好適な標識、ならびにプローブおよびリガンドを標識する方法は当該技術分野で知られており、例えば、公知の方法（例えば、ニック・トランスレーション、ランダム・プライミングまたはキネーシング ( k i n a s i n g ) ）によって取り込ませ得る放射性標識、ビオチン、蛍光基、化学ルミネセンス基（例えば、ジオキセタン、特に活性化ジオキセタン）、酵素、抗体、金ナノ粒子等が含まれる。この基本的スキームの変形は当該技術分野で知られており、外来材料および/または標識基からのシグナルを増幅させるものから、検出すべきハイブリッドの分離を促進する種々の変形が含まれる。多数のこれらの変形は、例えばM a t t h e w s およびK r i c k a , 1988; L a n d e g r e n ら, 1988; M i f f l i n , 1989; 米国特許第4,868,105号; およびE P O 公開番号225,807号にレビューされている。 30

#### 【0130】

前記したごとく、非-PCRベースのスクリーニングアッセイも、本発明に考慮されている。この手法は、核酸プローブ（または、正常なホスホジエステルに代るホスホン酸メチルのごときアナログ）を低レベルのDNA標的にハイブリダイズさせる。このプローブは、共有結合がハイブリダイゼーションの特異性を妨害しないように、プローブと共有結合した酵素を有し得る。ついで、この酵素-プローブ-コンジュゲート-標的核酸複合体を、プローブを含まない酵素コンジュゲートから単離し、酵素検出のために基質を添加する。酵素活性は、感度で $10^3 - 10^6$ の上昇を生じる発色またはルミネセント出力における変化として観察される。オリゴデオキシヌクレオチド-アルカリホスファターゼ・コンジュゲートの調製に関する例、およびハイブリダイゼーション・プローブとしてのその用途に関してはJ a b l o n s k i ら, 1986を参照されたい。 40

#### 【0131】

二工程標識増幅法は当該技術分野で知られている。これらのアッセイは、（ジゴキシゲニ 50

ン、ピオチン等のごとき) 小さなリガンドが S C N 5 A を特異的に結合することができる核酸プローブに結合するという原理で働く。対立遺伝子特異的なプローブもこの例の範囲内に意図され、例示的な対立遺伝子特異的なプローブには、この開示の素因突然変異を含むプローブが含まれる。

#### 【0132】

1つの例において、核酸プローブに結合した小リガンドは、抗体-酵素コンジュゲートによって特異的に認識される。この例の1つの具体例において、ジゴキシゲニンを核酸プローブに結合する。ハイブリダイゼーションは、化学ルミネセンス基質を代謝させる抗体-アルカリホスファターゼ・コンジュゲートによって検出する。この具体例による核酸プローブを標識する方法に関しては、例えば Martin ら, 1990 を参照されたい。第2の例においては、小リガンドは、第1のリガンドに特異的に複合体形成 (complexing) することができる第2のリガンド-酵素コンジュゲートによって認識される。この例のよく知られている具体例は、ピオチン-アビジン型の相互作用である。核酸プローブを標識するための方法およびピオチン-アビジンをベースとするアッセイに関しては、Rigby ら, 1977 および Nguyen ら, 1992 を参照されたい。

10

#### 【0133】

本発明の核酸プローブアッセイが S C N 5 A を検出することができる核酸プローブのカクテルを用いるであろうことも本発明の趣旨の範囲内に考慮される。かくして、細胞試料中の S C N 5 A の存在を検出するための1つの例において、遺伝子に相補的な1を超えるプローブを用い、特に、異なるプローブの数は択一的に2、3または5の異なる核酸プローブ配列である。もう1つの例において、患者の S C N 5 A 遺伝子配列中の突然変異の存在を検出するために、これらの遺伝子に相補的な1を超えるプローブを用い、ここにカクテルは S C N 5 A 中に変化を有する患者の集団中に同定される対立遺伝子-特異的突然変異に結合することができるプローブを含む。この具体例において、いずれの数のプローブをも用い得、好ましくは L Q T への個人の素因を作るものとして同定された腫瘍遺伝子突然変異に対応するプローブが含まれるであろう。

20

#### 【0134】

使用方法：ペプチド診断および診断キット

薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対する素因の存在は、野生型 S C N 5 A ポリペプチドの変化に基づいても検出し得る。かかる変化は、慣用技術による配列分析によって判定し得る。より好ましくは、抗体(ポリクローナルまたはモノクローナル)を用いて、S C N 5 A ペプチド中の相異または S C N 5 A ペプチドの不存在を検出する。抗体を生起し、精製する技術は当該技術分野でよく知られており、いずれのかかる技術を選択して、本発明に特許請求した調製を達成し得る。本発明の好ましい具体例において、抗体は溶液から S C N 5 A タンパク質を免疫沈降させ、ならびにポリアクリルアミド・ゲルのウエスタンまたはイムノブロット上のこれらのタンパク質と反応するであろう。もう1つの好ましい具体例において、免疫組織化学技術を用いて、抗体はパラフィンまたは凍結組織切片中の S C N 5 A タンパク質を検出するであろう。

30

#### 【0135】

S C N 5 A またはそれらの突然変異を検出する方法に関連する好ましい具体例には、モノクローナルおよび/またはポリクローナル抗体を用いる、サンドイッチアッセイ酵素結合免疫ソルベントアッセイ (E L I S A )、ラジオイムノアッセイ (R I A )、イムノラジオメトリックアッセイ (I R M A ) およびイムノ酵素アッセイ (I E M A ) が含まれる。例示的なサンドイッチアッセイは出典明示して本明細書の一部とみなす、米国特許第 4, 376, 110 号および第 4, 486, 530 号中で、David らによって記載されている。

40

#### 【0136】

使用方法：合理的薬剤設計

合理的薬剤設計の目標は、例えば、より活性または安定な形態のポリペプチドであるか、または例えばポリペプチドの機能をイン・ビボ (in vivo) で高めるか妨害する薬

50

剤を形成する目的で、目的の生物学的に活性なポリペプチドの構造アナログまたはそれと相互作用する小分子（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、インヒビター）の構造アナログを作成することである。例えば、Hodgsonら、1991を参照されたい。1つのアプローチにおいて、まず目的のタンパク質（例えば、SCN5Aポリペプチド）の三次元構造をx線結晶学によるか、コンピュータ・モデリングによるか、または最も典型的には組合せアプローチによって決定する。あまり頻繁にあることではないが、ポリペプチドの構造に関する有用な情報は、相同タンパク質の構造に基づいてモデリングすることによって得ることができる。合理的ドラッグ・デザインの例は、HIVプロテアーゼ・インヒビターの開発である（Ericssonら、1990）。加えて、ペプチド（例えば、SCN5Aポリペプチド）はアラニン・スキャンによって分析する（Wellis、1991）。この技術においては、アミノ酸残基をAlaで置換し、ペプチドの活性に対するその効果を判定する。ペプチドの各アミノ酸残基をこの様にして分析して、ペプチドの重要な領域を決定する。

10

20

30

40

50

#### 【0137】

機能アッセイによって選抜した標的・特異的抗体を単離し、ついでその結晶構造を解像することも可能である。原則的に、このアプローチにより、二次的ドラッグ・デザインが基礎とし得るファーマココアが得られる。機能的で、薬理学的に活性な抗体に対する抗-イディオ抗体（抗-id）を生成することによって、タンパク質結晶学を全く迂回することが可能である。鏡像の鏡像として、抗-idの結合部位は、元の受容体のアナログであると予想されよう。ついで、抗-idを用いて、ペプチドの化学的または生物学的に生成したバンクからペプチドを同定し、単離し得るであろう。ついで、選択したペプチドはファーマココアとして作用するだろう。

#### 【0138】

かくして、例えば、改善されたSCN5Aポリペプチド活性または安定性を有する、またはSCN5Aポリペプチド活性のインヒビター、アゴニスト、アンタゴニスト他として作用する薬剤を設計し得る。クローン化SCN5A配列の入手可能性によって、x線結晶学のごとき分析研究を行うために有用な十分な量のSCN5Aポリペプチドを作成し得る。加えて、本明細書中に記載するSCN5Aタンパク質配列の知見は、x線結晶学の代わりまたはそれに加えて、コンピュータ・モデリング技術を用いることに案内するであろう。

#### 【0139】

使用方法：遺伝子治療

本発明により、突然変異SCN5A対立遺伝子を運搬する細胞に野生型SCN5A機能を提供する方法も提供される。かかる機能を提供することは、レシピエント細胞の正常機能化を許容するだろう。野生型遺伝子または遺伝子の一部分は、遺伝子が染色体外に残るようなベクターで、細胞に導入し得る。かかる状況においては、遺伝子は染色体外の場所から細胞によって発現されるであろう。より好ましくは、細胞中に存在する内因性突然変異遺伝子と野生型遺伝子またはその一部分とが組換わるように、突然変異細胞に野生型遺伝子またはその一部分を導入する状況である。かかる組換えには、遺伝子突然変異の修正を生じる二重組換え事象を必要とする。組換え用および染色体外維持用の双方の遺伝子を導入するためのベクターは当該技術分野で知られており、いずれの好適なベクターも用い得る。エレクトロポレーション、リン酸カルシウム共沈およびウイルス導入のごときDNAを細胞に導入するための方法は当該技術分野で知られており、方法の選択は実施者の能力範囲内である。

#### 【0140】

前記に一般的に論じたごとく、SCN5A遺伝子またはフラグメントは、適用可能な場合には、細胞におけるかかる遺伝子の発現産物の量を増加させるために、遺伝子療法に用い得る。また、それは、突然変異遺伝子が“正常”レベルで発現されているが遺伝子産物が完全に機能的でない心細胞中でさえ、所与の野生型SCN5Aの発現のレベルを増大させるのにも有用となり得る。

## 【0141】

遺伝子治療は、一般的に受入れられている方法に従って、例えばFriedman(1991)またはCulver(1996)によって記載されているごとく、行われるであろう。患者からの細胞は、まず、前記した診断方法によって分析して、細胞中のSCN5Aポリペプチドの産生を確認するであろう。発現制御エレメントに連結したSCN5A遺伝子のコピーを含み、細胞の内側で複製することができるウイルスまたはプラスミド・ベクター(下記のさらなる詳細を参照されたい)を調製する。ベクターは細胞の内側で複製することができる。別法として、ベクターは複製欠損とすることができ、それは遺伝子治療において使用するためにヘルパー細胞中で複製する。米国特許第5,252,479号および国際公開WO98/07282号および米国特許第5,691,198号;第5,747,469号;第5,436,146号および第5,753,500号に開示されているとき、好適なベクターが知られている。ついで、ベクターを患者に注射する。トランスフェクトした遺伝子が各標的細胞のゲノムに不変的に取り込まれない場合には、治療を定期的に繰返さなければならない。

10

## 【0142】

当該技術分野で知られている遺伝子移入系は、本発明の遺伝子治療の実施に有用となり得る。これらには、ウイルスおよび非ウイルス移入法が含まれる。多種のウイルスが遺伝子移入ベクターまたは遺伝子移入ベクターを調製するための基礎として用いられており、それには、パポバウイルス(例えば、SV40, Madzakら, 1992)、アデノウイルス(Berkner, 1992; Berknerら, 1988; Gorzigliら, 1992; Kapiikian, 1992; Quantinら, 1992; Rosenfeldら, 1992; WilkinsonおよびAkrigg, 1992; Stratford-Perricaudetら, 1990; Schneiderら, 1998)、ワクシニアウイルス(Moss, 1992; Moss, 1996)、アデノ随伴ウイルス(Muzyczka, 1992; Ohira, 1990; RussellおよびHirata, 1998)、HSVおよびEBVを含むヘルペスウイルス類(Mardolskee, 1992; Johnsonら, 1992; Finkら, 1992; BreakefieldおよびGeller, 1987; Freeseら, 1990; Finkら, 1996)、レンチウイルス(Naldiniら, 1996)、シンドビスおよびセムリキ森林ウイルス(Berglundら, 1993)、ならびに鳥類の(BandyopadhyayおよびTemin, 1984; Petropoulosら, 1992)、げっ歯類の(Miller, 1992; Millerら, 1985; Sorgeら, 1984; MannおよびBaltimore, 1985; Millerら, 1988)およびヒト起源の(Shimadaら, 1991; Helsethら, 1990; Pageら, 1990; BuchschacherおよびPanganiban, 1992)レトロウイルスが含まれる。大部分のヒト遺伝子治療プロトコルは、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスも用いられているが、無力化したげっ歯類のレトロウイルスに基づいている。

20

30

## 【0143】

当該技術分野で知られている非ウイルス性遺伝子移入法には、リン酸カルシウム共沈法(Grahamおよびvan der Eb, 1973; Pellicerら, 1980); 例えば、マイクロインジェクションのような機械的技術(Andersonら, 1980; Gordonら, 1980; Brinsterら, 1981; CostantiniおよびLacy, 1981); リポソームを介する膜融合媒介移入(Felgnerら, 1987; WangおよびHuang, 1989; Kanedaら, 1989; Stewartら, 1992; Nabelら, 1990; Limら, 1991); ならびに直接DNA取込みおよび受容体-媒介DNA移入(Wolffら, 1990; Wuら, 1991; Zenkeら, 1990; Wuら, 1989; Wolffら, 1991; Wagnerら, 1990; Wagnerら, 1991; Cottenら, 1990; Curielら, 1992; Curielら, 1991)。ウイルス-媒介遺伝子移入は、リポソーム・デリバリーを用いる直接イン・ビボ遺伝子移入と組合せて、ウイルス・ベクターを腫瘍細胞

40

50

胞に指向させるが周りの非分裂細胞には指向させないことが許容される。別法として、レトロウイルスベクター産生 (producer) セルラインを腫瘍に注射し得る (Culverら, 1992)。その場合、プロデューサー細胞の注射により、ベクター粒子の連続した供給源が提供されるであろう。この技術は、手術不可能な脳腫瘍を患う患者における使用につき認可されている。

#### 【0144】

生物学的遺伝子移入法と物理学的遺伝子移入法とを組合せるアプローチにおいては、いずれかのサイズのプラスミドDNAを、アデノウイルス・ヘキソタンパク質に特異的なポリリシン・コンジュゲート抗体と組合せ、得られた複合体をアデノウイルス・ベクターに結合する。この場合、三分子複合体を用いて、細胞に感染させる。アデノウイルス・ベクターにより、効果的な結合、内在化、およびカップリングしたDNAが損傷される前のエンドソームの分解が許容される。アデノウイルスベースのベクターをデリバリーする他の技術に関しては、Schneiderら (1998) および米国特許第5,691,198号; 第5,747,469号; 第5,436,146号および第5,753,500号を参照されたい。

10

#### 【0145】

リボソーム/DNA複合体は、直接イン・ビボ遺伝子移入を媒介し得ることが示されている。標準的なリボソーム調製物では遺伝子移入プロセスは非特異的であるが、例えば、直接イン・サイチュ (in situ) 投与に従って、局在化したイン・ビボ取込みおよび発現が腫瘍デポジットで報告されている (Nabel, 1992)。

20

#### 【0146】

遺伝子治療の文章における発現ベクターは、その中にクローン化されたポリヌクレオチドを十分に発現する配列を含有する構築物を含むことを意味する。ウイルス発現ベクターにおいては、構築物には当該構築物のパッケージングを支持するのに十分なウイルス配列が含まれる。ポリヌクレオチドがSCN5Aをコードする場合には、発現によりSCN5Aが産生されるであろう。ポリヌクレオチドがアンチセンス・ポリヌクレオチドまたはリボザイムをコードする場合には、発現によりアンチセンス・ポリヌクレオチドまたはリボザイムが産生されるであろう。したがって、この文章において、発現はタンパク質が合成されることを必要としない。発現ベクターにクローン化したポリヌクレオチドに加えて、ベクターには、真核生物細胞におけるプロモーター機能も含まれる。クローン化したポリヌクレオチド配列は、このプロモーターの制御下にある。好適な真核生物プロモーターには、前記したものが含まれる。発現ベクターには、本明細書中に記載した選択マーカーおよび他の配列のごとき配列も含まれ得る。

30

#### 【0147】

DNAを心臓組織に直接標的化する遺伝子移入技術が好ましい。受容体・媒介遺伝子移入は、例えば、ポリリシンを介して (通常は共有的に超コイル化したプラスミドの形態の) DNAをタンパク質リガンドにコンジュゲートすることによって行う。リガンドは、標的細胞/組織タイプの細胞表面上の対応するリガンド受容体の存在に基づいて選択する。これらのリガンド-DNAコンジュゲートは、望なら血液に直接注射して、DNA-タンパク質コンジュゲートの受容体結合および内在化が起こる標的組織に指向させ得る。DNAの細胞内破壊の問題を克服するためには、アデノウイルスの同時感染を含めてエンドソーム機能を破壊し得る。当該治療は以下の通りである: SCN5A感受性対立遺伝子を運搬する患者を、その心臓先駆細胞の幾つかまたは全てが機能性正常SCN5A対立遺伝子の少なくとも1のさらなるコピーを受け取るように、遺伝子デリバリーで治療する。この工程において、治療した個人は、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動の危険性が正常対立遺伝子の存在によって感受性対立遺伝子の効果が押しとどめられる程度まで低下する。

40

#### 【0148】

使用方法: ペプチド治療

SCN5A活性を有するペプチドを、突然変異または欠失SCN5A対立遺伝子を運搬す

50

る細胞に供給することができる。タンパク質は、例えば公知の発現ベクターを用いて、細菌中のcDNA配列を発現させることによって産生し得る。別法として、SCN5AポリペプチドはSCN5A-産生哺乳動物細胞から抽出し得る。加えて、合成化学の技術を用いてSCN5Aタンパク質を合成し得る。かかる技術のいずれかにより、SCN5Aタンパク質を含む本発明の調製物が提供され得る。該調製物は、実質的に他のヒトタンパク質を含まない。このことは、微生物中またはイン・ビトロで合成することによって容易に達成される。

#### 【0149】

活性SCN5A分子は、例えば、マイクロインジェクションによってかまたはリボソームを使用することによって細胞に導入し得る。別法として、ある種の活性分子は、能動的または拡散によって細胞によって取り込まれ得る。SCN5A活性を有する分子の供給は、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動の部分的な復帰に通じるにちがいない。SCN5A活性を有する他の分子（例えば、ペプチド、薬剤または有機化合物）を用いてもかかる復帰に作用し得る。実質的に同様な機能を有する修飾ポリペプチドもペプチド治療に用いる。

10

#### 【0150】

使用方法：形質転換宿主

治療剤をテストするための動物は、完全な動物の突然変異の後に、または生殖細胞または接合体の処理後に選択できる。かかる処理は、通常、別の動物種からの突然変異SCN5A対立遺伝子の挿入、ならびに破壊した相同遺伝子の挿入を含む。あるいは、動物の内因性SCN5A遺伝子は、従来技術（Capecci, 1989; Valancius および Smithies, 1991; Hastys, 1991; Shinkai, 1992; Mombaerts, 1992; Philpotts, 1992; Snouwaert, 1992; Donehower, 1992）を用いて、挿入または欠失の突然変異、または他の遺伝子変更によって破壊できる。試験物質を動物に投与した後、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対する素因を評価しなければならない。試験物質が薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動の出現を防止するか、あるいは抑制する場合、試験物質は薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動の予防のための候補治療剤である。これらの動物モデルは、潜在的な治療製品用の非常に重要な試験ビヒクルを供する。

20

30

#### 【0151】

SCN5A遺伝子突然変異と薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動との間の関連性の同定は、個人の早期の前症候性スクリーニングが薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動の発生について危険性のある個人を同定することを可能とする。かかる個人を同定するために、SCN5A対立遺伝子を、突然変異につき直接的にまたは対立遺伝子のクローニング後のいずれかにスクリーニングする。対立遺伝子はいずれかの適当な技術、限定されるものではないが、以下の方法のうちのいずれかを用いて、正常な対立遺伝子からの核酸配列の差異の存在につき試験する：蛍光イン・サイチュ・ハイブリダイゼーション（FISH）、直接DNA配列決定、PFGE分析、サザンブロット解析、一本鎖立体構造解析（SSCP）、連鎖解析、RNアーゼ保護アッセイ、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド（ASO）、ドットブロット分析およびPCR-SSCP分析。また、最近開発された技術のDNAマイクロチップ技術も有用である。例えば、（1）クローン化した対立遺伝子および正常SCN5A遺伝子の両方のヌクレオチド配列または適当なフラグメント（コード配列またはゲノム配列）を決定し、ついで比較する、あるいは、（2）SCN5A遺伝子または遺伝子フラグメントのRNA転写体を、試験すべき個人からの一本鎖全ゲノムDNAにハイブリダイズさせ、得られたヘテロデュプレックスをリボヌクレアーゼA（RNアーゼA）で処理し、変性ゲル上で泳動させていずれかの誤対合の位置を検出する。これらの方法のうちの2は以下の手順により行うことができる。

40

#### 【0152】

試験すべき個人のSCN5A遺伝子の対立遺伝子を、従来技術を用いてクローニングする

50

。例えば、血液試料を個人から得る。この試料中の細胞から単離したゲノムDNAを、ほぼ20kbの平均フラグメントサイズに部分的に消化する。18-21kbの範囲にあるフラグメントを単離する。得られたフラグメントを、適当なベクターに連結する。ついで、クローンの配列を決定し、正常SCN5A遺伝子と比較する。

#### 【0153】

別法として、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)をSCN5A遺伝子の5'領域またはSCN5A遺伝子のエクソンについてのプライマー・ペアを用いて行う。また、PCRは、正常SCN5A遺伝子のいずれかの配列に基づいたプライマーを用いて行うこともできる。例えば、イントロンの1のプライマー・ペアを調製し、利用できる。最終的に、RT-PCRをmRNAに対して行ってもよい。ついで、増幅産物を、従来技術を用いる一本鎖立10  
体構造多型(SSCP)によって解析していずれかの差異を同定し、ついでこれらを配列決定し、正常な遺伝子配列と比較する。

#### 【0154】

適当なプライマー・ペアを用いて個人のDNAを増幅させ、その増幅産物を、例えば対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド・プローブを用いるドットプロット・ハイブリダイゼーションによって分析することによって、個人を一般的なSCN5A遺伝子変異について迅速にスクリーニングし得る。

#### 【0155】

第二の方法は、正常SCN5A遺伝子と欠陥遺伝子との間の差異の検出を補助するためにRNAアーゼAを用いる。この比較はプローブとしてSCN5A遺伝子の小さな(〜50020  
bp)制限フラグメントを用いる工程で行なう。最初に、SCN5A遺伝子を、遺伝子配列をほぼ500bpのフラグメントに切断する制限酵素(群)で消化する。これらのフラグメントを電気泳動ゲル上で分離し、ゲルから精製し、個別に、両方の向きでSP6ベクター(例えば、pSP64またはpSP65)にクローニングする。SCN5A遺伝子フラグメントのインサートを含むSP6ベースのプラスミドを、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ の存在下にて、当該技術分野においてよく知られたSP6転写系を用いてイン・ビトロ(in2  
v i t r o)で転写させ、当該遺伝子の両鎖のラジオアイソトープ標識RNA転写物を作り出す。

#### 【0156】

個々に、これらのRNA転写物を用いて、従来技術を用いて対立遺伝子DNAとヘテロデュプレックスを形成させる。SCN5Aフラグメントと個人からのSCN5A対立遺伝子30  
サブクローンとの間の配列の差異のためにRNA:DNAヘテロデュプレックスに生じた誤対合は、RNAアーゼAで処理した場合にそのRNA鎖中に切断を生じる。かかる誤対合は個人の対立遺伝子中の点突然変異または小さな欠失の結果である可能性がある。RNA鎖の切断により2以上の小さなRNAフラグメントが得られ、それは、RNAプローブ自体よりも変性ゲル上で速く泳動される。

#### 【0157】

遺伝試験により、実務者は、出生時または出生前でさえ、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワントおよび心室細動の危険性のある個人を同定することができるであろう。薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワントおよび心室細動の前症候診断により、この障害の予防が可能となるであろう。薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワントおよび心室細動の遺伝試験および改善された機作的理解は、合理的な療法を通して生命を脅かす不整脈を予防する機会を提供する。例えば、ナトリウムチャネル遮断剤は、SCN5Aの機能を変化させる突然40  
変異を有する患者に有効な治療となり得る。最後に、不整脈がしばしば異常な心臓再分極と関連し、先天性および後天性因子の組合せから生じ得るため、これらの研究は一般的な不整脈の基礎をなす機作に対する洞察を提供し得る。

#### 【0158】

医薬組成物および投与経路

本発明のSCN5Aポリペプチド、抗体、ペプチドおよび核酸は、医薬組成物中に処方され、それは慣用的な医薬調合技術によって調製される。例えば、Remington's 50

Pharmaceutical Science、18版(1990, Mack Publishing Co., Easton, PA)を参照されたい。当該組成物は、有効剤または有効剤の医薬上許容し得る塩を含み得る。これらの組成物は、有効物質のうちの1に加えて、医薬上許容し得る賦形剤、担体、緩衝剤、安定剤または当該技術分野においてよく知られている他の物質を含有できる。かかる物質は、無毒であり、有効成分の効力を妨害しないものでなければならない。担体は、例えば、静脈内、経口、鞘内、神経弓上または非経口的に投与するのに望ましい調製物の形態に依存して非常に様々な形態をとり得る。

#### 【0159】

経口投与については、該化合物は、カプセル剤、丸剤、錠剤、ロゼンジ、メルト、散剤、懸濁剤または乳剤のような固体または液体の調製物に処方化し得る。経口投与形態に組成物を調製することにおいて、(例えば、懸濁剤、エリキシル剤および液剤のごとき)経口液体調製物の場合には、例えば、水、グリコール、油剤、アルコール、矯味剤、保存剤、着色剤、懸濁化剤等のごときいずれの通常の医薬媒体;または(例えば、散剤、カプセル剤および錠剤のごとき)経口固体調製物の場合には、デンプン、砂糖、希釈剤、顆粒化剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤等のごとき担体を用いてもよい。投与における容易さのために、錠剤およびカプセル剤は、最も有利な経口投与単位形態を示し、その場合には、固体医薬担体を明らかに用いる。望むなら、錠剤は、標準的技術によって糖衣または腸溶性コーティングし得る。有効剤は、胃腸管を安定に通過し、同時に脳血液関門を安定に通過するのを可能とするためにカプセル化し得る。例えば、WO96/11698を参照されたい。

10

20

#### 【0160】

非経口投与については、該化合物は、医薬担体に溶解し、液剤または懸濁剤のいずれで投与してもよい。適当な担体の例示は、水、生理食塩水、ブドウ糖溶液、果糖溶液、エタノール、または動物、植物または合成の起源の油である。また、該担体は、他の成分、例えば、保存剤、懸濁化剤、可溶化剤、緩衝剤等を含有し得る。化合物を髄腔内投与する場合、それは脳脊髄液に溶解することもできる。

#### 【0161】

有効剤は、好ましくは、治療上有効量で投与する。投与する実際の量および投与の速度および時間経過は、治療すべき症状の性質および重篤度に依存するであろう。治療の処方、例えば、投与量、時期等の決定は、開業医または専門医の責任内にあり、典型的には、治療すべき疾患、個々の患者の症状、出井バリー部位、投与方法および医師に知られた他の因子を考慮する。技術およびプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciencesに見出すことができる。

30

#### 【0162】

あるいは、ターゲティング療法を用いて、抗体または細胞特異的リガンドのごときターゲティング・システムの使用によって、ある種のタイプの細胞に有効剤をより特異的にデリバリーし得る。ターゲティングは、例えば、薬剤が受入れられない毒性であるか、あるいはそれが余りにも高用量を必要とするか、あるいは標的細胞に入ることができないような場合には、様々な理由のために望ましい。

40

#### 【0163】

これらの薬剤を直接投与する代わりに、それを、標的細胞、例えば、前記のウイルス・ベクターで、または患者への埋込みのために設計された、米国特許第5,550,050号に記載され、PCT国際公開番号WO92/19195、WO94/25503、WO95/01203、WO95/05452、WO96/02286、WO96/02646、WO96/40871、WO96/40959およびWO97/12635に記載されているごとき細胞ベースのデリバリーシステムで産生できる。当該ベクターは、治療すべき特定の細胞にターゲティングでき、標的細胞により組織特異的である調節エレメントを含み得る。細胞ベースのデリバリーシステムは、所望の標的部位にて、患者の体に埋込むように設計され、有効剤のためのコード配列を含有する。別法として、該剤は、治療さ

50

れるべき細胞において産生されるか、あるいはそれにターゲティングされる有効剤によって活性形態に変換するための前駆体形態でも投与し得る。例えば、E P 4 2 5 , 7 3 1 A および W O 9 0 / 0 7 9 3 6 を参照されたい。

【 0 1 6 4 】

#### 実施例

本発明を以下の実施例でさらに詳細に説明するが、それは説明目的のものであって如何なる場合においても本発明を限定することを意図するものではない。当該技術分野でよく知られている標準的な技術または以下に詳細に説明する技術を利用する。

【 0 1 6 5 】

#### 実施例 1

薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツと関連する S C N 5 A 突然変異の同定

不整脈はしばしば薬物療法、最も一般的には抗不整脈薬を用いた治療から生じる。この不整脈の遺伝的基礎を決定するために、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に罹った個人を、公知の不整脈遺伝子中の突然変異についてスクリーニングした。スクリーニングされた遺伝子のうちの 1 は S C N 5 A であり、その配列を配列番号： 1 に示す。コードされる S C N 5 A タンパク質を配列番号： 2 に示す。この配列は、受託番号 N M 0 0 0 3 3 5 として G e n B a n k から入手可能である。配列番号： 3 に示す S C N 5 A 変異型が 4 のアフリカ系アメリカ人において見出され、そのうちの 3 はアミオダロン治療後に、1 はブレピタルの注入後に不整脈を経験した。この変異型は 2 のさらなるアフリカ系アメリカ人においても見出された。6 の個人はすべて、4 の薬剤誘導型不整脈症例において悪化した心電図上の Q T 間隔の延長を有していた。

【 0 1 6 6 】

これらの個人において示された突然変異は、S C N 5 A コード配列の塩基 3 3 0 8 における変化であり、そこでは野生型の C が突然変異版においては A となっている。これは、この場所で野生型において見出されるセリンの代わりにアミノ酸残基 1 1 0 3 にチロシンを有するコードタンパク質を生じる。この S 1 1 0 3 変異型は試験したアフリカ系アメリカ人の 1 1 % に存在したが、他の人種群においては見出されなかった。

【 0 1 6 7 】

S 1 1 0 3 Y 変異型は、5 0 0 V、室温にて一晚泳動した 0 . 5 × M D E ゲル ( M u t a t i o n D e t e c t i o n E n h a n c e m e n t ; F M C B i o P r o d u c t s ) 上で検出した。

【 0 1 6 8 】

#### 実施例 2

薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を治療または予防するのに有用な薬物候補のスクリーニングアッセイ

配列番号： 4 のタンパク質をコードする S C N 5 A を有する個人は、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対して感受性である。薬剤は、例えば薬剤誘導効果を妨害するように突然変異 S C N 5 A に結合することによって、これらの効果を予防し得る。薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を予防することにおけるかかる薬剤の作用の機構が無関係なかかる薬剤をスクリーニングするためのアッセイを行い得る。

【 0 1 6 9 】

A . イン・ビトロ ( i n v i t r o ) アッセイ

当該アッセイは、突然変異 S C N 5 A を発現する第 1 のセットの細胞を浴用溶液に入れ、S C N 5 A ナトリウムチャネルを横切る電流を誘導し、最初に誘導された電流を測定する。野生型 S C N 5 A を発現する第 2 のセットの細胞を別の浴用溶液に入れ、電流を誘導し、第 2 の誘導電流を測定する。薬剤を溶液中の第 1 のセットの細胞に添加し、電流を誘導し、第 3 の誘導電流を測定する。第 1 および第 3 の電流の測定に対する第 2 の電流の測定の順番は無関係である。薬剤が第 1 の誘導電流よりも第 2 の誘導電流により類似する第 3 の誘導電流を生じた場合には、当該薬剤は突然変異 S C N 5 A を有する個人を治療する薬

10

20

30

40

50

剤候補であり、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動の発生を治療または予防する。好ましくは、突然変異SCN5Aを発現し、野生型SCN5Aは発現しない細胞を用いる。かかる細胞は、トランスジェニック細胞を作製するかまたはカエル卵母細胞のごとき細胞に突然変異SCN5Aを発現するRNAを注入することによって調製する。この開示における“細胞”なる語には、組織試料ならびに単一細胞が含まれる。

#### 【0170】

##### B．イン・ビボ (in vivo) アッセイ

イン・ビトロ (in vitro) 法に類似するアッセイを、野生型SCN5Aまたは突然変異SCN5Aのいずれかを発現するトランスジェニック動物に対して行う。電流を誘導し、誘導電流の測定を行う。突然変異SCN5Aを発現するトランスジェニック動物は薬剤処理なしおよび薬剤処理ありで測定し、その測定を野生型SCN5Aを発現する動物における誘導電流と比較する。薬剤処理したトランスジェニック動物における誘導電流が野生型動物における誘導電流と比較した非薬剤処理突然変異動物における誘導電流よりも野生型動物における誘導電流により類似する場合には、当該薬剤は突然変異SCN5Aを有する個人を治療するための薬剤候補である。

10

#### 【0171】

薬剤がSCN5Aを有する個人においてトルサード・デ・ポワンツを誘導し得るかを判定するアッセイ

ある種の薬剤がある種の個人においてトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を引起こすことが知られている。本明細書中で示したごとく、SCN5A S1103Y突然変異を有する個人はある種の薬剤でもってかかる薬剤誘導効果に罹りやすい。他の薬剤もこの突然変異を有する個人においてトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を引起こし得るかを判定するアッセイを行い得る。

20

#### 【0172】

##### A．イン・ビトロアッセイ

1のアッセイは、突然変異SCN5Aを発現する細胞を浴用溶液に入れ、SCN5A  $Na^+$  チャネルを横切る電流を誘導してその誘導電流を測定し、ついで試験すべき薬剤を浴用溶液に添加し、電流を誘導し、この第2の誘導電流を測定することを含む。当該薬剤が誘導電流に対して何ら効果を有していない場合には、それは、突然変異の結果としてこの突然変異を有する個人にトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を誘導しないであろう。当該薬剤が誘導電流に対して実際に影響する場合、それは該突然変異を有する個人にトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を誘導し得る。

30

#### 【0173】

##### B．イン・ビボアッセイ

薬剤がSCN5A中に特定の突然変異を有する個人にトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を引起こし得るかを試験するためのイン・ビボ (in vivo) アッセイは、突然変異SCN5Aを発現するように突然変異SCN5Aを有するトランスジェニック動物を調製し、突然変異SCN5Aを発現する細胞のSCN5A  $Na^+$  チャネルを横切る電流を誘導し、試験すべき薬剤をトランスジェニック動物に投与し、電流を誘導し、この第2の電流と薬剤不存在下で誘導された電流とを比較することである。当該薬剤が誘導電流に対して何ら効果を有していない場合には、それは、突然変異の結果としてSCN5A突然変異を有する個人においてトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を引起こさないであろう。

40

#### 【0174】

##### C．イン・ビボアッセイ

第2のイン・ビボアッセイは、突然変異SCN5A遺伝子が発現するトランスジェニック動物を調製し、ついで試験すべき薬剤を該動物に投与することである。ついで、該動物を観察して、トルサード・デ・ポワンツまたは心室細動が引き起こるかを判定する。何らかの有害な事象が起こらなければ、該薬剤は突然変異を有する個人にそれらの障害を誘導しないであろう。薬剤を投与した場合に、かかる事象がトランスジェニック動物において

50

は実際に起こるが、野生型 S C N 5 A を発現する動物において起こらなければ、当該薬剤は突然変異の結果として S C N 5 A 突然変異を有する個人にトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を誘導し得る。

【0175】

実施例 4

S C N 5 A に対するポリクローナル抗体の生成

S C N 5 A コード配列のセグメントをイー・コリ (E . c o l i ) 中で融合タンパク質として発現させる。過剰発現されたタンパク質をゲル溶出によって精製し、それを用いて H a w l o w および L a n e ( 1 9 8 8 ) によって記載されている手法に類似する手法を用いてウサギおよびマウスに免疫接種する。この手法は種々のほかのタンパク質に対する抗体 ( A b ) を生成することが示されている (例えば、K r a e m e r ら , 1 9 9 3 を参照されたい)。

【0176】

簡単には、S C N 5 A コーディング配列のストレッチをプラスミド p E T 5 A ( N o v a g e n , I n c . , M a d i s o n , W I ) 中に融合タンパク質としてクローン化する。I P T G で誘導した後に、予想分子量を有する融合タンパク質の過剰発現を S D S / P A G E によって確認する。融合タンパク質は電気溶出によってゲルから精製する。S C N 5 A 融合産物としてのタンパク質の同定は、N - 末端のタンパク質配列決定によって確認する。つぎに、精製したタンパク質をウサギにおける免疫源として用いる。ウサギを完全フロイントアジュバント中の 1 0 0  $\mu$  g のタンパク質で免疫接種し、3 週間隔で 2 回、最初に不完全フロイントアジュバント中の 1 0 0  $\mu$  g の免疫源を用い、つづいて P B S 中の 1 0 0  $\mu$  g の免疫源を用いて追加免疫する。抗体を含有する血清をその後 2 週間に採取する。

【0177】

この手法を繰返して、S C N 5 A 遺伝子産物の突然変異形態に対する抗体を生成する。野生型 S C N 5 A に対する抗体と組み合わせたこれらの抗体を用いて、種々の組織および生物流体中の突然変異形態の存在および相対的レベルを検出する。

【0178】

実施例 5

S C N 5 A に対して特異的なモノクローナル抗体の生成

モノクローナル抗体は以下のプロトコールに従って生成する。よく知られているごとくグルタルアルデヒドまたは E D C を用いてキーホール・リンペット・ヘモシアニンにコンジュゲートしたインタクト S C N 5 A または S C N 5 A ペプチド (野生型または突然変異型) を含む免疫源をマウスに免疫接種する。

【0179】

該免疫源をアジュバントと混合する。各マウスには、1 0 ないし 1 0 0  $\mu$  g の免疫源を 4 回注射し、4 回目の注射の後にマウスから採血し、血清が抗原に対する抗体を含んでいるかを判定する。血清価は E L I S A または R I A によって測定する。免疫源に対する抗体の存在を示す血清を有するマウスをハイブリドーマ作成用に変換する。

【0180】

免疫マウスから脾臓を取出し、単細胞懸濁液を調製する ( H a r l o w および L a n e , 1 9 8 8 を参照されたい)。細胞融合は、本質的には K o h l e r および M i l s t e i n ( 1 9 7 5 ) によって記載されているごとく行う。簡単には、P 3 . 6 5 . 3 ミエローマ細胞 ( A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n , R o c k v i l l e , M D ) を、H a r l o w および L a n e ( 1 9 8 8 ) によって記載されているごとくポリエチレングリコールを用いて免疫脾臓細胞と融合する。9 6 ウェル組織培養プレートに、細胞を  $2 \times 10^5$  細胞 / ウェルの密度で播く。増殖について個々のウェルを調べ、増殖しているウェルの上清を野生型または突然変異 S C N 5 A 標的タンパク質を用いる E L I S A または R I A によって S C N 5 A 特異的抗体の存在について試験する。陽性ウェル中の細胞を広げ、サブクローニングしてモノクローナル性を確立し、確認する

。

所望の特異性を有するクローンをマウス中で腹水としてまたは中空系系において広げ、増殖させて、特徴付けおよびアッセイ開発に十分な量の抗体を生成する。

## 【0181】

## 実施例6

SCN5Aについてのサンドイッチアッセイ

モノクローナル抗体をプレート、チューブ、ビーズまたは粒子のごとき固体表面に結合させる。好ましくは、抗体は96-ウェルELISAプレートのウェル表面に結合させる。SCN5Aペプチド/タンパク質(野生型および突然変異型)を含有する100μLの試料(例えば、血清、尿、組織サイトゾル)を固相の抗体に添加する。その試料を室温にて2時間インキュベートする。つぎに、試料流体をデカンテーションし、固相を緩衝液で洗浄して結合しなかった物質を除去する。100μLの(SCN5Aペプチド/タンパク質上の異なる抗原決定基に対する)第2のモノクローナル抗体を固相に添加する。この抗体をディテクター分子(例えば、<sup>125</sup>I、酵素、発蛍光団または発色団)で標識し、第2の抗体を有する固相を室温にて2時間インキュベートする。第2の抗体をデカンテーションし、その固相を緩衝液で洗浄して結合しなかった物質を除去する。

10

## 【0182】

試料中に存在するSCN5Aペプチド/タンパク質の量に比例する結合標識の量を定量化する。野生型SCN5Aに対して特異的なモノクローナル抗体ならびにSCN5A中に同定した各突然変異に対して特異的なモノクローナル抗体を用いて別のアッセイを行う。

20

## 【0183】

## 実施例7

SCN5A Na<sup>+</sup>チャンネルに影響する薬剤をスクリーニングするアッセイ

SCN5Aが心臓ナトリウムチャンネルを形成するという知見を用いれば、ここでこのチャンネルに対して効果を有するであろう薬剤についてスクリーニングするためのアッセイを発明することができる。この遺伝子SCN5Aを卵母細胞または哺乳動物細胞にトランスフェクトし、前記のごとく発現させる。トランスフェクションは野生型または特異的に突然変異したSCN5Aを用いて行う。トランスフェクションに用いる遺伝子が薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対する素因を引起す突然変異を含む場合、野生型遺伝子でトランスフェクトしたものと比較して誘導電流における変化が見られる。薬剤候補をトランスフェクトした細胞の浴用溶液に添加して、誘導電流に対する薬剤候補の効果を試験する。野生型SCN5Aでトランスフェクトした細胞で見られる電流に近いように誘導電流を変化させる薬剤候補は、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を治療するのに有用である。

30

## 【0184】

本発明の好ましい態様の詳細に参照して本特許出願に本発明を開示したが、この開示は限定的な意味ではなく説明目的のものであって、当業者であれば、本発明の趣旨および添付した請求の範囲内で変形が容易に思い付くことは予想される。

## 【0185】

## 参考文献のリスト

- Altshul SF, ら (1997). Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402.
- Anand, R (1992). Techniques for the Analysis of Complex Gnomes, (Academic Press).
- Anderson WF, ら (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5399-5403.
- Antzelevitch C and Sicouri S (1994). J. Am. Coll. Card. 23: 259-277.
- Antzelevitch C, ら (1999). J. Electrocardiol. 32 (Suppl. 1): [158-165.]

40

50

- Attali B, ㄆ (1993). Nature 365: [850 - 852.]
- Attwell D, ㄆ (1979). Pflugers Arch. 379: 137 - 142.
- Ausubel FM, ㄆ (1992). Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, New York, NY).
- Bandyopadhyay PK and Temin HM (1984). Mol. Cell. Biol. 4: 749 - 754.
- Bartel PL, ㄆ (1993). "Using the 2-hybrid system to detect protein-protein interactions." In Cellular Interactions in Development: A Practical Approach, Oxford University Press, pp. 153 - 179.
- Bazzett H (1920). Heart 7: 353 - 370.
- Beaucage SL and Caruthers MH (1981). Tetra. Letts. 22: 1859 - 1862.
- Berglund P, ㄆ (1993). Biotechnology 11: 916 - 920.
- Berkner KL, ㄆ (1988). BioTechniques 6: 616 - 629.
- Berkner KL (1992). Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158: 39 - 66.
- Borman S (1996). Chemical & Engineering News, December 9 issue, pp. 42 - 43.
- Breakefield XOおよびGeller AI (1987). Mol. Neurobiol. 1: 337 - 371.
- Brister RL, ㄆ (1981). Cell 27: 223 - 231.
- Bruggemann A, ㄆ (1993). Nature 365: 445 - 448.
- Buchsacher GLおよびPanganiban AT (1992). [J VIROL.] 66: 2731 - 2739.
- Busch AE, ㄆ (1992). Science 255: 1705 - 1707.
- Capeocchi MR (1989). Science 244: 1288.
- Cardiac ARRHYTHMIA SUPPRESSION TRIAL INVESTIGATORS (1992). N. Engl. J Med 327: 227 - 233.
- Cariello NF (1988). Am. J Human Genetics 42: 726 - 734.
- Chee M, ㄆ (1996). Science 274: 610 - 614.
- Chevray PMおよびNathans DN (1992). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5789 - 5793.
- Compton J (1991). Nature 350: 91 - 92.
- Conner BJ, ㄆ [(1983).] Proc. Natl. [ACAD. SCI. USA] 80: 278 - 282.
- Costantini FおよびLacy E (1981). Nature 294: 92 - 94.
- Cotten M, ㄆ (1990). Proc. Natl. Acad. Sci. USA [87]: 4033 - 4037.
- Cotton RG, ㄆ (1988). Proc. Natl. Acad. Sci.

- USA 85 : 4397 - 4401 .  
 Couderc JP , ㄹ ( 1999 ) . Pacing Clin . Electrophysiol . 22 : 1581 - 1592 .  
 Culver KW , ㄹ ( 1992 ) . Science 256 : 1550 - 1552 .  
 Culver K ( 1996 ) . Gene Therapy : A Primer for Physician , 2nd Ed . , Mary Ann Liebert .  
 Curiel DT , ㄹ ( 1991 ) . Proc . Natl . Acad . Sci . USA 88 : 8850 - 8854 .  
 Curiel DT , ㄹ ( 1992 ) . Hum . Gene Ther 3 : 147 - 154 . 10  
 Curran ME , ㄹ ( 1995 ) . Cell 80 : 795 - 804 .  
 DeRisi J , ㄹ ( 1996 ) . Nat . Genet . 14 : 457 - 460 .  
 Deschenes I , ㄹ ( 2000 ) . Cardiovasc . Res . 46 : 55 - 65 .  
 Deutscher M ( 1990 ) . Meth . Enzymology 182 : 83 - 89 ( Academic Press , San Diego , CAL .  
 Donehower LA , ㄹ ( 1992 ) . Nature 356 : 215 .  
 Duggal P ㄹ ( 1998 ) . Circulation 97 : 142 - 146 . 20  
 Editorial ( 1996 ) . Nature Genetics 14 : 367 - 370 .  
 Elghanian R , ㄹ ( 1997 ) . Science 277 : 1078 - 1081 .  
 Enhancers and Eukaryotic Gene Expression , Cold Spring Harbor Press , Cold Spring Harbor , NY ( 1983 ) .  
 Erickson J , ㄹ ( 1990 ) . Science 249 : 527 - 533 .  
 Fahy E , ㄹ ( 1991 ) . PCR METHODS APPL . 1 : 25 - 33 30  
 Felgner PL , et [ AL . ] ( 1987 ) . Proc . Natl . Acad . Sci . USA [ 84 ] : 7413 - 7417 .  
 Fields SおよびSong O - K ( 1989 ) . Nature 340 : 245 - 246 .  
 Fiers W , ㄹ ( 1978 ) . Nature 273 : 113 - 120 .  
 Fink DJ , ㄹ ( 1992 ) . Hum . Gene Ther . 3 : 11 - 19 .  
 Fink DJ , ㄹ ( 1996 ) . Ann . Rev . Neurosci . 19 : 265 - 287 .  
 Finkelstein J , ㄹ ( 1990 ) . GETZOMICS 7 : 167 - 172 . 40  
 Fodor SPA ( 1997 ) . Science 277 : 393 - 395 .  
 Freese A , ㄹ ( 1990 ) . Biochem . Pharmacol . 40 : 2189 - 2199 .  
 Friedman T ( 1991 ) . In Therapy for Genetic Diseases , T . Friedman , ed . , Oxford University Press , pp . 105 - 121 .  
 Gellens M , ㄹ ( 1992 ) . Proc . Natl . Acad . Sci . USA 89 : 554 - 558 .  
 George AL , ㄹ ( 1995 ) . Cytogenet . Cell . Genet . 68 : 67 - 70 . 50

- Glover D (1985). DNA Cloning, I and II (Oxford Press).
- Goding (1986). Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed. (Academic Press, N. Y.).
- Godwiski PJ, ら (1988). Science 241: 812 - 816.
- Goldstein SANおよびMiller C (1991). Neuron [7]: 403 - 408.
- Gordon JW, ら (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7380 - 7384. 10
- Gorziglia MおよびKapikian AZ (1992). J Virol. 66: 4407 - 4412.
- Graham FLおよびvan der Eb AJ (1973). Virology 52: 456 - 467.
- Grompe M (1993). Nature Genetics 5: 111 - 117.
- Grompe M, ら (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5855 - 5892.
- Guthrie GおよびFink GR (1991). Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press). 20
- Hacia JG, ら (1996). Nature Genetics 14: 441 - 447.
- Harlow EおよびLane D (1988). Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- Hasty PK, ら (1991). Nature 350: 243.
- Hausdorff SF, ら (1991). BIOCHEM. 30: 3341 - 3346.
- Helseth E, ら (1990). J Virol. 64: 2416 - 2420 30
- Hodgson J (1991). Bio/Technology 9: 19 - 21.
- Huse WD, ら (1989). Science 246: 1275 - 1281.
- Innis MA, ら (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, San Diego, CA).
- Jablonski E, ら (1986). Nucl. Acids Res. 14: 6115 - 6128.
- Jakoby WBおよびPastan IH (eds.) (1979). Cell Culture. Methods in ENZYMOLOGY Vol. 58 (Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich (NY)). 40
- January CTおよびRiddle JM (1989). Circ. Res. 64: 977 - 990.
- Jervell AおよびLange-Nielsen [F] (1957). Am. Heart J 54: 59 - 68.
- Jiang C, ら (1994). Nat. Genet. 8: 141 - 147.
- Johnson PA, ら (1992). J. Virol. 66: 2952 - 2965.
- Johnson, ら (1993). "Peptide Turn Mimetics" 50

- in Biotechnology and Pharmacy, Pezzuto S, eds., Chapman and Hall, New York.
- Kambouris NG, S (2000). J Clin. Invest. 105: 1133 - 1140.
- Kaneda Y, S (1989). J Biol. Chem. 264: 12126 - 12129.
- Kanehisa M (1984). Nucl. Acids Res. 12: 203 - 213.
- Kannel WB, S (1987). Am. Heart J. 113: 799 - 804.
- Keating MT, S (1991A). SCIENCE 252: 704 - 706.
- Keating MT, S (1991B). Am. J hum. Genet. 49: 1335 - 1339.
- Kinszler KW, S (1991). Science 251: 1366 - 1370.
- Kohler GおよびMilstein C (1975). Nature 256: 495 - 497.
- Kraemer FB, S (1993). J. Lipid Res. 34: 663 - 672.
- Kubo T, S (1988). FEBS Lett. 241: 119.
- Kyte JおよびDoolittle RF (1982). J. Mol. Biol. 157: 105 - 132.
- Landegren U, S (1988). Science 242: 229 - 237.
- Lee JE, S (1995). Science 268: 836 - 844.
- Lesage F, S (1993). Receptors and Channels 1: 143 - 152.
- Lim CS, S (1991). Circulation 83: 2007 - 2011.
- Lipshutz RJ, S (1995). BioTechniques 19: 442 - 447.
- Lockhart DJ, S (1996). Nature Biotechnology 14: 1675 - 1680.
- Madzak C, S (1992). J. Gen. Virol. 73: 1533 - 1536.
- Maniatis T, S (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- Mann RおよびBaltimore D (1985). J Virol. 54: 401 - 407.
- Margokiske RF (1992). Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158: 67 - 95.
- Martin R, S (1990). BioTechniques 9: 762 - 768.
- Matteucci MDおよびCaruthers MH (1981). J. Am. Chem. Soc. 103: 3185.
- Matthews JAおよびKricka LJ (1988). Anal. Biochem. 169: 1.
- Merrifield B (1963). R. Am. Chem. Soc. 85: 2

- 149 - 2156 .
- Metzger D, ㇿ (1988) . Nature 334 : 31 - 36 .
- Mifflin TE (1989) . Clinical Chem. 35 : 1819 - 1825 .
- Miller AD (1992) . [CURR.] Top. [MICROBIOL. Immunol. 158 : [1 - 24.]
- Miller AD, ㇿ (1985) . [MOL. CELL. BIOL.] 5 : 431 - 437 .
- Miller AD, ㇿ (1988) . J. Virol. 62 : 4337 - 4345 . 10
- Modrc lip (1991) . ANN. REV. GENET.] 25 : 229 - 253 .
- Mombaerts P, ㇿ (1992) . Cell 68 : [869.]
- Moss AJおよびMcDonald J (1971) . N. Engl. J. Med. 285 : 903 - 904 .
- Moss AJ, ㇿ (1991) . Circulation [84] : 1136 - 1144 .
- Moss B (1992) . Curr. Top. [MICROBIOL.] Immunol. 158 : [25 - 38.]
- Moss B (1996) . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 20 : [11341 - 11348.]
- Muzyczka N (1992) . Curr. Top. [MICROBIOL.] Immunol. [158] [: 97 - 129.]
- Nabel EG, ㇿ (1990) . Science 249 : [1285 - 1288.]
- Nabel (1992) . Hum. Gene [THER.] 3 : 399 - 410 .
- Naldini L, ㇿ (1996) . Science 272 : 263 - 267 .
- Newton [CR,] ㇿ (1989) . Nucl. Acids Res. 17 : 2503 - 2516 . 30
- Neyroud N, ㇿ (1997) . Nat. Genet. 15 : [186 - 189.]
- Nguyen Q, ㇿ (1992) . BioTechniques 13 : 116 - 123 .
- Novack DF, ㇿ (1986) . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 586 - 590 .
- Oh S, ㇿ (1990) . Gene 89 : 279 - 282 .
- Orita M, ㇿ (1989) . Proc. Natl. Acad. [SCI.] USA 86 : 2766 - 2770 .
- Page KA, ㇿ (1990) . [J] [VIROL.] 64 : 5270 - 52 40 76 .
- Pellicer A, ㇿ (1980) . Science 209 : 1414 - 1422 .
- Petropoulos CJ, ㇿ (1992) . J [VIROL.] 66 : 3391 - 3397 .
- Philpott KL, ㇿ (1992) . Science 256 : 1448 .
- [QUANTINB, ET] al. (1992) . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : [2581 - 2584.]
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA) 50

- .
- Rigby PWJ, ㇏ (1977). [J] Mol. Biol. 113: [237-251.]
- Romano C (1965). Lancet [I658-659.]
- Romano C, ㇏ (1963). Clin. Pediatr. 45: 656-683.
- Rook MB, ㇏ (1999). [CARDIOVASC.] Res. 44: 507-517.
- Rosenfeld MA, ㇏ (1992). Cell 68: 143-155.
- Ruano GおよびKidd KK (1989). Nucl. Acids Res. 10 17: 8392.
- Russell MW, ㇏ (1995). Am. [J HUM. GENET.] 57: 503-507.
- Russell DおよびHirata R (1998). Nature Genetics 18: [323-328.]
- Sambrook J, ㇏ (1989). Molecular Cloning: A Laboratory [MANUAL, 2ND] Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, [NY]) .]
- Sanguinetti MC, ㇏ (1996). Nature 384: 80-83 20 .
- Scharf SJ, ㇏ [(1986).] Science 233: 1076-1078.
- Schneider G, ㇏ [(1998).] Nature Genetics [18]: [180-183.]
- Schott J, ㇏ (1995). Am. J. Hum. Genet. 57: 1114-1122.
- Schultze-Bahr E, ㇏ (1997). Nat. Genet. 17: [267-268.]
- Schwartz PJ, ㇏ (1975). Am. [HEART J.] 109: 3 30 78-390.
- Schwartz P.T, ㇏ (1994). "The long QT syndrome." In Cardiac Electrophysiology: from cell to bedside. D. P. Zipes and J. Jalife eds. (W. B. Sanders Company) pp. [788-811.]
- Scopes R (1982). Protein Purification: Principles and Practice, (Springer-Verlag, [NY])
- Sheffield VC, ㇏ (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA [86]: 232-236.
- Sheffield VC, ㇏ (1991). Am. J Hum. Genet. 49 40 : 699-706.
- Shenk TE, ㇏ (1975). Proc. [NATL. ACAD. SCI. USA] 72: 989-993.
- Shimada T, ㇏ (1991). J. Clin. Invest. 88: 1043-1047.
- Shinkai Y, ㇏ (1992). Cell 68: 855.
- Shoemaker DD, ㇏ (1996). Nature Genetics 14: 450-456.
- Snouwaert JN, ㇏ (1992). Science 257: 1083.
- Sorge J, ㇏ (1984). Mol. Cell. Biol. [4]: 17 50

- 30 - 1737 .
- Spargo CA , ㇿ ( 1996 ) . Mol . Cell . Probes 10 : [ 247 - 256 . ]
- Splawski I , ㇿ ( 1997a ) . N . Engl . [ J ] Med . 336 : 1562 - 1567 .
- Splawski [ I , ] ㇿ ( 1997b ) . Nat . Genet . 17 : [ 338 - 340 . ]
- Stewart MJ , ㇿ ( 1992 ) . Hum . Gene [ THER . ] 3 : 267 - 275 .
- Stratford - Perricaudet LD , ㇿ ( 1990 ) . Hum . G 10  
ene Ther . 1 : [ 241 - 256 . ]
- [ SURAWICZ B ] ( 1989 ) . J . Am . Coll . Cardiol . 14 : [ 172 - 184 . ]
- Takumi T , ㇿ ( 1988 ) . Science 242 : 1042 - 1045 .
- Takumi T , ㇿ ( 1991 ) . [ R ] [ BIOL . ] Chem . 266 : 22192 - 22198 .
- Tyson J , ㇿ ( 1997 ) . [ HUNE . ] Mol . Genet . 6 : [ 2179 - 2185 . ]
- [ VALANCIUS VおよびSMITHIES O ( 1991 ) . MOL . CEL 20  
L BIOL . ] 11 : 1402 .
- Veldkamp MW , ㇿ ( 2000 ) . [ CIRC . ] Res . 12 : [ E91 - E97 . ]
- Vetter DE , ㇿ ( 1996 ) . Neuron 17 : 1251 - 1264 .
- Vincent GM , ㇿ ( 1992 ) . [ N . ] Engl . [ J MED . ] 327 : [ 846 - 852 . ]
- Wagner E , ㇿ ( 1991 ) . [ PROC . NATL . ACAD . SCI . USA ] 88 : 4255 - 4259 .
- Wagner E , ㇿ ( 1990 ) . Proc . [ NATL . ACAD . SCI . USA ] 87 : 3410 - 3414 .
- Walker GT , ㇿ , ( 1992 ) . [ NUCL . ] Acids Res . 20 30  
: 1691 - 1696 .
- Wang CYおよびHuang L ( 1989 ) . Biochemistry [ 28 ] : [ 9508 - 9514 . ]
- Wang DW , ㇿ ( 1996 ) . Proc . Natl . Acad . [ SCI . ] USA 93 : 13200 - 13205 .
- Wang KWおよびGoldstein SA ( 1995 ) . Neuron [ 14 ] : 1303 - 1309 .
- Wang KW , ㇿ ( 1996 ) . Neuron [ 16 ] : 571 - 577 .
- Wang Q , ㇿ ( 1995 ) . Cell 80 : 805 - 811 .
- Wang Q , ㇿ ( 1996 ) . [ NAT . ] Genet . 12 : [ 17 - 23 . 40  
]
- Ward OC ( 1964 ) . [ J ] Ir . Med . [ ASSOC . ] 54 : 103 - 106 .
- Warmke JEおよびGanetzky B ( 1994 ) . Proc . Natl . Acad . Sci . 91 : 3438 - 3442 .
- Wartell RM , ㇿ ( 1990 ) . Nucl . Acids Res . 18 : [ 2699 - 2705 . ]
- Wells JA ( 1991 ) . Methods Enzymol . 202 : 390 - 411 .
- Wetmur JGおよびDavidson N ( 1968 ) . [ J ] [ MOL . BI 50

OL. ] 31 : 349 - 370 .  
White MB , ら ( 1992 ) . Genomics 12 : 301 - 306 .  
White RおよびLalouel JM [ ( 1988 ) . ] Annu . Rev . G  
enet . [ 22 ] : 259 - 279 .  
Wilkinson GWおよび [ AKRIGG ] A ( 1992 ) . [ NUCLEICA  
CIDS RES . 20 ] : 2233 - 2239 .  
Willrich SN , ら [ ( 1987 ) . ] Am . J . Cardio . 60 : 8  
01 - 806 .  
[ WOLFFJA , ] ら ( 1990 ) . Science 247 : 1465 - 146  
8 . 10  
Wolff JA , ら ( 1991 ) . BioTechniques 11 : 474 - 4  
85 .  
Wu DYおよびWallace RB ( 1989 ) . Genomics 4 : 560  
- 569 .  
Wu CH , ら ( 1989 ) . [ J BIOL CHEM . ] 264 : 16985 - 1  
6987 .  
Wu GY , ら ( 1991 ) . [ J . ] Biol . Chem . 266 : [ 1433  
8 - 14342 . ]  
Zenke M , ら ( 1990 ) . Proc . Natl . Acad . Sci . US  
A 87 : 3655 - 3659 . 20  
Zipres DP ( 1987 ) . Am . [ J ] Cardio . 59 : [ 26E - 3  
1E . ]  
特許および特許出願 :  
欧州特許出願公開番号 0 3 3 2 4 3 5  
EPO公開番号 2 2 5 , 8 0 7  
Hitzeman ら , EP 73 , 6 7 5 A  
EP 425 , 7 3 1 A  
WO 84 / 0 3 5 6 4  
WO 90 / 0 7 9 3 6  
WO 92 / 1 9 1 9 5 30  
WO 93 / 0 7 2 8 2  
WO 94 / 2 5 5 0 3  
WO 95 / 0 1 2 0 3  
WO 95 / 0 5 4 5 2  
WO 96 / 0 2 2 8 6  
WO 96 / 0 2 6 4 6  
WO 96 / 1 1 6 9 8  
WO 96 / 4 0 8 7 1  
WO 96 / 4 0 9 5 9  
WO 97 / 0 2 0 4 8 40  
WO 97 / 1 2 6 3 5 40  
米国特許第 3 , 8 1 7 , 8 3 7  
米国特許第 3 , 8 5 0 , 7 5 2  
米国特許第 3 , 9 3 9 , 3 5 0  
米国特許第 3 , 9 9 6 , 3 4 5  
米国特許第 4 , 2 7 5 , 1 4 9  
米国特許第 4 , 2 7 7 , 4 3 7  
米国特許第 4 , 3 6 6 , 2 4 1  
米国特許第 4 , 3 7 6 , 1 1 0  
米国特許第 4 , 4 8 6 , 5 3 0 50

米国特許第 4 , 5 5 4 , 1 0 1  
米国特許第 4 , 6 8 3 , 1 9 5  
米国特許第 4 , 6 8 3 , 2 0 2  
米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7  
米国特許第 4 , 8 6 8 , 1 0 5  
米国特許第 5 , 2 5 2 , 4 7 9  
米国特許第 5 , 2 7 0 , 1 8 4  
米国特許第 5 , 4 0 9 , 8 1 8  
米国特許第 5 , 4 3 6 , 1 4 6  
米国特許第 5 , 4 5 5 , 1 6 6  
米国特許第 5 , 5 5 0 , 0 5 0  
米国特許第 5 , 6 9 1 , 1 9 8  
米国特許第 5 , 7 3 5 , 5 0 0  
米国特許第 5 , 7 4 7 , 4 6 9  
米国特許第 5 , 8 4 6 , 7 1 0  
米国特許第 5 , 8 5 6 , 0 9 2  
米国特許第 5 , 8 8 8 , 8 1 9  
米国特許第 6 , 0 0 4 , 7 4 4

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/08381 A2**

- (51) International Patent Classification: C12G
- (21) International Application Number: PCT/US01/22639
- (22) International Filing Date: 19 July 2001 (19.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/219,738 20 July 2000 (20.07.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION [US/US],  
615 Arapen Drive, Suite 110, Salt Lake City, UT 84108 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): KEATING, Mark, T. [US/US]; 1 Mason Street, Brookline, MA 02446 (US).  
SPLAWSKI, Igor [PL/US]; 36 Queensberry Street, Apt. 7, Boston, MA 02215 (US).
- (74) Agents: SAXE, Stephen, A. et al.; Rothwell, Figg, Ernst & Manbeck, P.C., 555 13th Street, N.W., Suite 701-E, Washington, DC 20004 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report  
— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/08381 A2

(54) Title: COMMON POLYMORPHISM IN SCN5A IMPLICATED IN DRUG-INDUCED CARDIAC ARRHYTHMIA

(57) Abstract: The present invention is directed to a specific mutation in SCN5A which causes drug-induced torsade de pointes or ventricular fibrillation. Persons with the mutation are predisposed to developing drug-induced torsade de pointes or ventricular fibrillation when administered certain drugs. This predisposition can be diagnosed in accordance with the present invention by analyzing the DNA sequence of the SCN5A of an individual. By screening patients for the mutation, drug-induced torsade de pointes or ventricular fibrillation can be avoided. Furthermore, drugs can be tested to determine whether they will cause torsade de pointes or ventricular fibrillation.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

1

TITLE OF THE INVENTIONCOMMON POLYMORPHISM IN *SCN5A* IMPLICATED IN DRUG-INDUCED CARDIAC ARRHYTHMIA5 BACKGROUND OF THE INVENTION

Sudden deaths from cardiac arrhythmias account for 11% of all natural deaths. Arrhythmias frequently result from treatment with medications, most commonly antiarrhythmic drugs.

10 Long QT Syndrome (LQTS) is a cardiovascular disorder characterized by prolongation of the QT interval on electrocardiogram and presence of syncope, seizures and sudden death. Five genes have been implicated in Romano-Ward syndrome, the autosomal dominant form of LQTS. These genes are *KVLQT1*, *HERG*, *SCN5A*, *KCNE1* and *KCNE2*. Mutations in *KVLQT1* and *KCNE1* also cause the Jervell and Lange-Nielsen syndrome, a form of LQTS associated with deafness, a phenotypic abnormality inherited in an autosomal recessive fashion.

15 The present invention relates to an alteration in the *SCN5A* gene and methods for detecting the alteration.

The publications and other materials used herein to illuminate the background of the invention or provide additional details respecting the practice, are incorporated by reference, and for convenience are respectively grouped in the appended List of References.

20 The present invention is directed to an alteration in the *SCN5A* gene and its gene products which are associated with drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation and to a process for the diagnosis and prevention of these disorders. These drug-induced physical disorders are diagnosed in accordance with the present invention by analyzing the DNA sequence of the *SCN5A* gene of an individual to be tested and comparing the DNA sequence to the known DNA sequence of the normal gene. Prediction of drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation will enable practitioners to prevent this disorder using existing medical therapy.

25 Cardiac arrhythmias are a common cause of morbidity and mortality, accounting for approximately 11% of all natural deaths (Kannel, 1987; Willich et al., 1987). In general, presymptomatic diagnosis and treatment of individuals with life-threatening ventricular tachyarrhythmias is poor, and in some cases medical management actually increases the risk of arrhythmia and death (Cardiac Arrhythmia Suppression Trial II Investigators, 1992). These

30

WO 02/08381

PCT/US01/22639

2

factors make early detection of individuals at risk for cardiac arrhythmias and arrhythmia prevention high priorities.

Both genetic and acquired factors contribute to the risk of developing cardiac arrhythmias. Long QT syndrome (LQT) is an inherited cardiac arrhythmia that causes abrupt loss of consciousness, syncope, seizures and sudden death from ventricular tachyarrhythmias, specifically *torsade de pointes* and ventricular fibrillation (Ward, 1964; Romano, 1965; Schwartz et al., 1975; Moss et al., 1991). This disorder usually occurs in young, otherwise healthy individuals (Ward, 1964; Romano, 1965; Schwartz et al., 1975). Most LQT gene carriers manifest prolongation of the QT interval on electrocardiograms, a sign of abnormal cardiac repolarization (Vincent et al., 1992). The clinical features of LQT result from episodic cardiac arrhythmias, specifically repolarization-related ventricular tachyarrhythmias like *torsade de pointes*, named for the characteristic undulating nature of the electrocardiogram in this arrhythmia and ventricular fibrillation (Schwartz et al., 1975; Moss and McDonald, 1971). *Torsade de pointes* may degenerate into ventricular fibrillation, a particularly lethal arrhythmia. Although LQT is not a common diagnosis, ventricular arrhythmias are very common; more than 300,000 United States citizens die suddenly every year (Kannel, et al., 1987; Willich et al., 1987) and, in many cases, the underlying mechanism may be aberrant cardiac repolarization. LQT, therefore, provides a unique opportunity to study life-threatening cardiac arrhythmias at the molecular level.

Both inherited and acquired forms of LQT have been defined. Acquired LQT and secondary arrhythmias can result from cardiac ischemia, bradycardia and metabolic abnormalities such as low serum potassium or calcium concentration (Zipes, 1987). LQT can also result from treatment with certain medications, including antibiotics, antihistamines, general anesthetics, and, most commonly, antiarrhythmic medications (Zipes, 1987). Inherited forms of LQT can result from mutations in at least five different genes. In previous studies, LQT loci were mapped to chromosome 11p15.5 (*KVLQT1* or LQT1) (Keating et al., 1991a; Keating et al., 1991b), 7q35-36 (*HERG* or LQT2), 3p21-24 (*SCN5A* or LQT3) (Jiang et al., 1994). Of these, the most common cause of inherited LQT is *KVLQT1*. Our data indicate that mutations in this gene are responsible for more than 50% of inherited LQT. A fourth LQT locus (*LQT4*) was mapped to 4q25-27 (Schott et al., 1995). Also, *KCNE1* (LQT5) has been associated with long QT syndrome (Splawski et al., 1997b; Duggal et al., 1998). These genes encode ion channels involved in

WO 02/08381

PCT/US01/22639

3

generation of the cardiac action potential. Mutations can lead to channel dysfunction and delayed myocellular repolarization. Because of regional heterogeneity of channel expression with the myocardium, the aberrant cardiac repolarization creates a substrate for arrhythmia. *KVLQT1* and *KCNE1* are also expressed in the inner ear (Neyroud et al., 1997; Vetter et al., 1996). We and others demonstrated that homozygous or compound heterozygous mutations in each of these genes can cause deafness and the severe cardiac phenotype of the Jervell and Lange-Nielsen syndrome (Neyroud et al., 1997; Splawski et al., 1997a; Schultze-Bahr et al., 1997; Tyson et al., 1997). Loss of functional channels in the ear apparently disrupts the production of endolymph, leading to deafness.

Presymptomatic diagnosis of LQT is currently based on prolongation of the QT interval on electrocardiograms. QTc (QT interval corrected for heart rate; Bazett, 1920) greater than 0.44 second has traditionally classified an individual as affected. Most LQT patients, however, are young, otherwise healthy individuals, who do not have electrocardiograms. Moreover, genetic studies have shown that QTc is neither sensitive nor specific (Vincent et al., 1992). The spectrum of QTc intervals for gene carriers and non-carriers overlaps, leading to misclassifications. Non-carriers can have prolonged QTc intervals and be diagnosed as affected. Conversely, some LQT gene carriers have QTc intervals of  $\leq 0.44$  second but are still at increased risk for arrhythmia. Correct presymptomatic diagnosis is important for effective, gene-specific treatment of LQT.

Autosomal dominant and autosomal recessive forms of this disorder have been reported. Autosomal recessive LQT (also known as Jervell and Lange-Nielsen syndrome) has been associated with congenital neural deafness; this form of LQT is rare (Jervell and Lange-Nielsen, 1957). Autosomal dominant LQT (Romano-Ward syndrome) is more common, and is not associated with other phenotypic abnormalities (Romano et al., 1963; Ward, 1964). A disorder very similar to inherited LQT can also be acquired, usually as a result of pharmacologic therapy (Schwartz et al., 1975; Zipes, 1987).

The data have implications for the mechanism of arrhythmias in LQT. Two hypotheses for LQT have previously been proposed (Schwartz et al., 1994). One suggests that a predominance of left autonomic innervation causes abnormal cardiac repolarization and arrhythmias. This hypothesis is supported by the finding that arrhythmias can be induced in dogs by removal of the right stellate ganglion. In addition, anecdotal evidence suggests that some

WO 02/08381

PCT/US01/22639

4

LQT patients are effectively treated by  $\beta$ -adrenergic blocking agents and by left stellate ganglionectomy (Schwartz et al., 1994). The second hypothesis for LQT-related arrhythmias suggests that mutations in cardiac-specific ion channel genes, or genes that modulate cardiac ion channels, cause delayed myocellular repolarization. Delayed myocellular repolarization could promote reactivation of L-type calcium channels, resulting in secondary depolarizations (January and Riddle, 1989). These secondary depolarizations are the likely cellular mechanism of *torsade de pointes* arrhythmias (Surawicz, 1989). This hypothesis is supported by the observation that pharmacologic block of potassium channels can induce QT prolongation and repolarization-related arrhythmias in humans and animal models (Antzelevitch and Sicouri, 1994). The discovery that one form of LQT results from mutations in a cardiac potassium channel gene supports the myocellular hypothesis.

In theory, mutations in a cardiac sodium channel gene could cause LQT. Voltage-gated sodium channels mediate rapid depolarization in ventricular myocytes, and also conduct a small current during the plateau phase of the action potential (Attwell et al., 1979). Subtle abnormalities of sodium channel function (e.g., delayed sodium channel inactivation or altered voltage-dependence of channel inactivation) could delay cardiac repolarization, leading to QT prolongation and arrhythmias. In 1992, Gellens and colleagues cloned and characterized a cardiac sodium channel gene, *SCN5A* (Gellens et al., 1992). The structure of this gene was similar to other, previously characterized sodium channels, encoding a large protein of 2016 amino acids. These channel proteins contain four homologous domains (DI-DIV), each of which contains six putative membrane spanning segments (S1-S6). *SCN5A* was mapped to chromosome 3p21, making it an excellent candidate gene for *LQT3* (George et al., 1995), and this gene was then proved to be associated with *LQT3* (Wang et al., 1995).

In 1994, Warmke and Ganetzky identified a novel human cDNA, human ether a-go-go related gene (*HERG*, Warmke and Ganetzky, 1994). *HERG* was localized to human chromosome 7 by PCR analysis of a somatic cell hybrid panel (Warmke and Ganetzky, 1994) making it a candidate for *LQT2*. It has predicted amino acid sequence homology to potassium channels. *HERG* was isolated from a hippocampal cDNA library by homology to the *Drosophila* ether a-go-go gene (*eag*), which encodes a calcium-modulated potassium channel (Bruggemann et al., 1993). *HERG* is not the human homolog of *eag*, however, sharing only ~50% amino acid sequence homology. *HERG* has been shown to be associated with *LQT2* (Curran et al., 1995).

WO 02/08381

PCT/US01/22639

5

LQT1 was found to be linked with the gene *KVLQT1* (Q. Wang et al., 1996). Sixteen families with mutations in *KVLQT1* were identified and characterized and it was shown that in all sixteen families there was complete linkage between LQT1 and *KVLQT1*. *KVLQT1* was mapped to chromosome 11p15.5 making it a candidate gene for LQT1. *KVLQT1* encodes a protein with structural characteristics of potassium channels, and expression of the gene as measured by Northern blot analysis demonstrated that *KVLQT1* is most strongly expressed in the heart. One intragenic deletion and ten different missense mutations which cause LQT were identified in *KVLQT1*. These data define *KVLQT1* as a novel cardiac potassium channel gene and show that mutations in this gene cause susceptibility to ventricular tachyarrhythmias and sudden death.

It was known that one component of the  $I_{Kr}$  channel is minK, a 130 amino acid protein with a single putative transmembrane domain (Takumi et al., 1988; Goldstein and Miller, 1991; Hausdorff et al., 1991; Takumi et al., 1991; Busch et al., 1992; Wang and Goldstein, 1995; KW Wang et al., 1996). The size and structure of this protein made it unlikely that minK alone forms functional channels (Attali et al., 1993; Lesage et al., 1993). Evidence was presented that *KVLQT1* and minK coassemble to form the cardiac  $I_{Kr}$  potassium channel (Sanguinetti et al., 1996).  $I_{Kr}$  dysfunction is a cause of cardiac arrhythmia. It was later shown that mutations in *KCNE1* (which encodes minK) also can result in LQT (Splawski et al., 1997b).

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to one mutation in *SCN5A* which has been associated with drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation.

In one aspect of the present invention, the association of a specific mutation in *SCN5A* with *torsade de pointes* and ventricular fibrillation is provided.

In a second aspect of the present invention, analysis of the *SCN5A* gene is provided for an early diagnosis of subjects susceptible to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation. The diagnostic method comprises analyzing the DNA sequence of *SCN5A* of an individual to be tested and comparing it with the DNA sequence of the native, non-variant gene. The ability to predict predisposition to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation will enable physicians to prevent these conditions in the susceptible patients by appropriate prescribing of medication.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

6

The invention is further directed to methods of screening drug candidates which can be used to treat or prevent *torsade de pointes* or ventricular fibrillation in patients with an *SCN5A* mutation which predisposes persons to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation. Another aspect of the invention is a method of screening drugs to determine whether they may result in the development of *torsade de pointes* or ventricular fibrillation when administered to a person with a mutation in *SCN5A*.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is directed to determining whether a patient has a specific mutation in *SCN5A* which will predispose him to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation. The present invention is further directed to methods of screening humans for the presence of this *SCN5A* gene variant which causes drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation. Since this predisposition can now be detected earlier (i.e., before symptoms appear) and more definitively, better treatment options will be available for those individuals identified as having the mutation. The present invention is also directed to methods for screening for drugs useful in treating or preventing *torsade de pointes* and ventricular fibrillation.

The present invention provides methods of screening the *SCN5A* gene to identify the specific mutation. Such methods may further comprise the step of amplifying a portion of the *SCN5A* gene, and may further include a step of providing a set of polynucleotides which are primers for amplification of said portion of the *SCN5A* gene. The method is useful for identifying mutations for use in either diagnosis of or prognosis of predisposition to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation.

The present invention is further directed to a method for screening drug candidates to identify drugs useful for treating or preventing *torsade de pointes* and ventricular fibrillation. Drug screening is performed by expressing mutant *SCN5A* in cells, such as oocytes, mammalian cells or transgenic animals, and assaying the effect of a drug candidate on the *SCN5A* sodium channel. The effect is compared to the wild-type *SCN5A* sodium channel activity.

The invention is further directed to methods of screening drugs to determine whether administration of a specific drug to a person with the mutant *SCN5A* will result in *torsade de pointes* or ventricular fibrillation in the person.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

7

Finally, the invention is directed to methods of testing compounds to determine if they are capable of modulating the activity of a mutated SCN5A protein.

Alterations in the *SCN5A* gene can result in a change in many physical characteristics of the Na<sup>+</sup> channel. These include, but are not limited to, ion specificity, length of inactivation, amplitude of current, voltage dependence of activation or inactivation, kinetics, and voltage threshold for activation. The prior art teaches a variety of physical properties whose activities are changed as a result of the presence of altered SCN5A. Publications which discuss some of these changes include Veldkamp et al. (2000), Kambouris et al. (2000), Deschenes et al. (2000), Rook et al. (1999), Antzelevitch et al. (1999), Couderc et al. (1999) and Wang et al. (1996). These altered physical characteristics can be modulated, i.e., they can be either increased or decreased by a measurable amount, by treatment with certain drugs. It is a desire to screen for drugs which will modulate the mutated SCN5A channels. In most cases it would be desirable to modulate the mutated SCN5A channels so that they will behave more like wild-type SCN5A channels and will result in beneficial effects for persons whose genome contains mutated *SCN5A* and who are being treated with these drugs. In the case of mutated SCN5A channels that have no detectable difference in activity when compared to wild-type SCN5A channels in the absence of certain drugs but exhibit altered functional characteristics compared to wild-type SCN5A channels in the presence of certain drugs, it would be desirable to use the mutated SCN5A channels to find drugs that would not modulate the activity of the mutated SCN5A channel when compared to the wild-type SCN5A channel.

According to the diagnostic and prognostic method of the present invention, alteration of the wild-type *SCN5A* gene is detected. In addition, the method can be performed by detecting the wild-type *SCN5A* gene and confirming the lack of a predisposition to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation as a result of this locus.

Useful diagnostic techniques include, but are not limited to fluorescent *in situ* hybridization (FISH), direct DNA sequencing, PFGE analysis, Southern blot analysis, single stranded conformation analysis (SSCA), RNase protection assay, allele-specific oligonucleotide (ASO), dot blot analysis and PCR-SSCP, as discussed in detail further below. Also useful is the recently developed technique of DNA microchip technology.

The presence of the SCN5A mutation which predisposes one to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation may be ascertained by testing any tissue of a human for the

WO 02/08381

PCT/US01/22639

8

mutation of the *SCN5A* gene. For example, a person who has inherited the *SCN5A* mutation in the germline would be predisposed to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation. This can be determined by testing DNA from any tissue of the person's body. Most simply, blood can be drawn and DNA extracted from the cells of the blood. In addition, prenatal diagnosis can be accomplished by testing fetal cells, placental cells or amniotic cells for the mutation of the *SCN5A* gene. Alteration of a wild-type *SCN5A* allele can be detected by any of the means discussed herein.

There are several methods that can be used to detect DNA sequence variation. Direct DNA sequencing, either manual sequencing or automated fluorescent sequencing can detect sequence variation. Another approach is the single-stranded conformation polymorphism assay (SSCP) (Orita et al., 1989). This method does not detect all sequence changes, especially if the DNA fragment size is greater than 200 bp, but can be optimized to detect most DNA sequence variation. The reduced detection sensitivity is a disadvantage, but the increased throughput possible with SSCP makes it an attractive, viable alternative to direct sequencing for mutation detection on a research basis. The fragments which have shifted mobility on SSCP gels are then sequenced to determine the exact nature of the DNA sequence variation. Other approaches based on the detection of mismatches between the two complementary DNA strands include clamped denaturing gel electrophoresis (CDGE) (Sheffield et al., 1991), heteroduplex analysis (HA) (White et al., 1992) and chemical mismatch cleavage (CMC) (Grompe et al., 1989). A review of currently available methods of detecting DNA sequence variation can be found in a recent review by Grompe (1993). Once a mutation is known, an allele specific detection approach such as allele specific oligonucleotide (ASO) hybridization can be utilized to rapidly screen large numbers of other samples for that same mutation. Such a technique can utilize probes which are labeled with gold nanoparticles to yield a visual color result (Elghanian et al., 1997). Other techniques for detecting mutations are known in the art and can be used. For example, single base extension methods, which are described in e.g., U.S. Patent Nos. 5,846,710, 6,004,744, 5,888,819 and 5,856,092, can be used to determine the identity of a single base to determine whether that location is mutated.

Detection of point mutations may be accomplished by molecular cloning of the *SCN5A* alleles and sequencing the alleles using techniques well known in the art. Also, the gene or

WO 02/08381

PCT/US01/22639

9

portions of the gene may be amplified, e.g., by PCR or other amplification technique, and the amplified gene or amplified portions of the gene may be sequenced.

There are six well known methods for a more complete, yet still indirect, test for confirming the presence of a susceptibility allele: 1) single stranded conformation analysis (SSCP) (Orita et al., 1989); 2) denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Wartell et al., 1990; Sheffield et al., 1989); 3) RNase protection assays (Finkelstein et al., 1990; Kinszler et al., 1991); 4) allele-specific oligonucleotides (ASOs) (Conner et al., 1983); 5) the use of proteins which recognize nucleotide mismatches, such as the *E. coli* mutS protein (Modrich, 1991); and 6) allele-specific PCR (Ruano and Kidd, 1989). For allele-specific PCR, primers are used which hybridize at their 3' ends to the particular *SCN5A* mutation. If the particular mutation is not present, an amplification product is not observed. Amplification Refractory Mutation System (ARMS) can also be used, as disclosed in European Patent Application Publication No. 0332435 and in Newton et al., 1989. Insertions and deletions of genes can also be detected by cloning, sequencing and amplification. In addition, restriction fragment length polymorphism (RFLP) probes for the gene or surrounding marker genes can be used to score alteration of an allele or an insertion in a polymorphic fragment. Such a method is particularly useful for screening relatives of an affected individual for the presence of the mutation found in that individual. Other techniques for detecting insertions and deletions as known in the art can be used.

In the first three methods (SSCP, DGGE and RNase protection assay), a new electrophoretic band appears. SSCP detects a band which migrates differentially because the sequence change causes a difference in single-strand, intramolecular base pairing. RNase protection involves cleavage of the mutant polynucleotide into two or more smaller fragments. DGGE detects differences in migration rates of mutant sequences compared to wild-type sequences, using a denaturing gradient gel. In an allele-specific oligonucleotide assay, an oligonucleotide is designed which detects a specific sequence, and the assay is performed by detecting the presence or absence of a hybridization signal. In the mutS assay, the protein binds only to sequences that contain a nucleotide mismatch in a heteroduplex between mutant and wild-type sequences.

Mismatches, according to the present invention, are hybridized nucleic acid duplexes in which the two strands are not 100% complementary. Lack of total homology may be due to deletions, insertions, inversions or substitutions. Mismatch detection can be used to detect point

WO 02/08381

PCT/US01/22639

10

mutations in the gene or in its mRNA product. While these techniques are less sensitive than sequencing, they are simpler to perform on a large number of samples. An example of a mismatch cleavage technique is the RNase protection method. In the practice of the present invention, the method involves the use of a labeled riboprobe which is complementary to the human wild-type *SCN5A* gene coding sequence. The riboprobe and either mRNA or DNA isolated from the person are annealed (hybridized) together and subsequently digested with the enzyme RNase A which is able to detect some mismatches in a duplex RNA structure. If a mismatch is detected by RNase A, it cleaves at the site of the mismatch. Thus, when the annealed RNA preparation is separated on an electrophoretic gel matrix, if a mismatch has been detected and cleaved by RNase A, an RNA product will be seen which is smaller than the full length duplex RNA for the riboprobe and the mRNA or DNA. The riboprobe need not be the full length of the mRNA or gene but can be a segment of either.

In similar fashion, DNA probes can be used to detect mismatches, through enzymatic or chemical cleavage. See, e.g., Cotton *et al.*, 1988; Shenk *et al.*, 1975; Novack *et al.*, 1986. Alternatively, mismatches can be detected by shifts in the electrophoretic mobility of mismatched duplexes relative to matched duplexes. See, e.g., Cariello, 1988. With either riboprobes or DNA probes, the cellular mRNA or DNA which might contain a mutation can be amplified using PCR (see below) before hybridization. Changes in DNA of the *SCN5A* gene can also be detected using Southern hybridization.

DNA sequences of the *SCN5A* gene which have been amplified by use of PCR may also be screened using allele-specific probes. These probes are nucleic acid oligomers, each of which contains a region of the gene sequence harboring a known mutation. For example, one oligomer may be about 30 nucleotides in length, corresponding to a portion of the gene sequence. By use of a battery of such allele-specific probes, PCR amplification products can be screened to identify the presence of a previously identified mutation in the gene. Hybridization of allele-specific probes with amplified *SCN5A* sequences can be performed, for example, on a nylon filter. Hybridization to a particular probe under high stringency hybridization conditions indicates the presence of the same mutation in the tissue as in the allele-specific probe.

The newly developed technique of nucleic acid analysis via microchip technology is also applicable to the present invention. In this technique, literally thousands of distinct oligonucleotide probes are built up in an array on a silicon chip. Nucleic acid to be analyzed is

WO 02/08381

PCT/US01/22639

11

fluorescently labeled and hybridized to the probes on the chip. It is also possible to study nucleic acid-protein interactions using these nucleic acid microchips. Using this technique one can determine the presence of mutations or even sequence the nucleic acid being analyzed or one can measure expression levels of a gene of interest. The method is one of parallel processing of many, even thousands, of probes at once and can tremendously increase the rate of analysis. Several papers have been published which use this technique. Some of these are Hacia et al., 1996; Shoemaker et al., 1996; Chee et al., 1996; Lockhart et al., 1996; DeRisi et al., 1996; Lipshutz et al., 1995. This method has already been used to screen people for mutations in the breast cancer gene *BRCA1* (Hacia et al., 1996). This new technology has been reviewed in a news article in Chemical and Engineering News (Borman, 1996) and been the subject of an editorial (Editorial, Nature Genetics, 1996). Also see Fodor (1997).

The most definitive test for mutations in a candidate locus is to directly compare genomic *SCN5A* sequences from patients with those from a control population. Alternatively, one could sequence messenger RNA after amplification, e.g., by PCR, thereby eliminating the necessity of determining the exon structure of the candidate gene.

Alteration of wild-type genes can also be detected by screening for alteration of wild-type *SCN5A* protein. For example, monoclonal antibodies immunoreactive with *SCN5A* can be used to screen a tissue. Lack of cognate antigen would indicate a mutation. Antibodies specific for products of mutant alleles could also be used to detect mutant gene product. Such immunological assays can be done in any convenient formats known in the art. These include Western blots, immunohistochemical assays and ELISA assays. Any means for detecting an altered *SCN5A* protein can be used to detect alteration of the wild-type *SCN5A* gene. Functional assays, such as protein binding determinations, can be used. In addition, assays can be used which detect *SCN5A* biochemical function.

A mutant *SCN5A* gene or gene product can also be detected in other human body samples, such as serum, stool, urine and sputum. The same techniques discussed above for detection of mutant genes or gene products in tissues can be applied to other body samples. By screening such body samples, a simple early diagnosis can be achieved for predisposition to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation.

The primer pairs of the present invention are useful for determination of the nucleotide sequence of a particular *SCN5A* allele using PCR. The pairs of single-stranded DNA primers for

WO 02/08381

PCT/US01/22639

12

*SCN5A* can be annealed to sequences within or surrounding the *SCN5A* gene in order to prime amplifying DNA synthesis of the gene itself. Allele-specific primers can also be used. Such primers anneal only to the particular *SCN5A* mutant allele, and thus will only amplify a product in the presence of the mutant allele as a template.

5 It is known that individuals with the wild-type *SCN5A* gene are not predisposed to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation. However, it is here shown that a specific mutation which interferes with the function of the *SCN5A* gene product is involved in predisposition to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation. Thus, the presence of an altered (or a mutant) *SCN5A* gene which produces a protein having a loss of function, or  
10 altered function, directly causes predisposition to *torsade de pointes* and ventricular fibrillation. In order to detect an *SCN5A* gene mutation, a biological sample is prepared and analyzed for a difference between the sequence of the allele being analyzed and the sequence of the wild-type allele. Mutant *SCN5A* alleles can be initially identified by any of the techniques described above. The mutant alleles are then sequenced to identify the specific mutation of the particular mutant  
15 allele. Alternatively, mutant alleles can be initially identified by identifying mutant (altered) proteins, using conventional techniques. The mutant alleles are then sequenced to identify the specific mutation for each allele. The mutations are then used for the diagnostic and prognostic methods of the present invention.

#### 20 Definitions

The present invention employs the following definitions.

"**Amplification of Polynucleotides**" utilizes methods such as the polymerase chain reaction (PCR), ligation amplification (or ligase chain reaction, LCR) and amplification methods based on the use of Q-beta replicase. Also useful are strand displacement amplification (SDA),  
25 thermophilic SDA, and nucleic acid sequence based amplification (3SR or NASBA). These methods are well known and widely practiced in the art. See, e.g., U.S. Patents 4,683,195 and 4,683,202 and Innis *et al.*, 1990 (for PCR); Wu and Wallace, 1989 (for LCR); U.S. Patents 5,270,184 and 5,455,166 and Walker *et al.*, 1992 (for SDA); Spargo *et al.*, 1996 (for thermophilic SDA) and U.S. Patent 5,409,818, Fahy *et al.*, 1991 and Compton, 1991 for 3SR and NASBA.  
30 Reagents and hardware for conducting PCR are commercially available. Primers useful to amplify sequences from the *SCN5A* region are preferably complementary to, and hybridize

WO 02/08381

PCT/US01/22639

13

specifically to sequences in the *SCN5A* region or in regions that flank a target region therein. *SCN5A* sequences generated by amplification may be sequenced directly. Alternatively, but less desirably, the amplified sequence(s) may be cloned prior to sequence analysis. A method for the direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic segments has been described by Scharf et al., 1986.

"**Analyte polynucleotide**" and "**analyte strand**" refer to a single- or double-stranded polynucleotide which is suspected of containing a target sequence, and which may be present in a variety of types of samples, including biological samples.

"**Antibodies.**" The present invention also provides polyclonal and/or monoclonal antibodies and fragments thereof, and immunologic binding equivalents thereof, which are capable of specifically binding to the *SCN5A* polypeptide and fragments thereof or to polynucleotide sequences from the *SCN5A* region. The term "**antibody**" is used both to refer to a homogeneous molecular entity, or a mixture such as a serum product made up of a plurality of different molecular entities. Polypeptides may be prepared synthetically in a peptide synthesizer and coupled to a carrier molecule (e.g., keyhole limpet hemocyanin) and injected over several months into rabbits. Rabbit sera is tested for immunoreactivity to the *SCN5A* polypeptide or fragment. Monoclonal antibodies may be made by injecting mice with the protein polypeptides, fusion proteins or fragments thereof. Monoclonal antibodies will be screened by ELISA and tested for specific immunoreactivity with *SCN5A* polypeptide or fragments thereof. See, Harlow and Lane, 1988. These antibodies will be useful in assays as well as pharmaceuticals.

Once a sufficient quantity of desired polypeptide has been obtained, it may be used for various purposes. A typical use is the production of antibodies specific for binding. These antibodies may be either polyclonal or monoclonal, and may be produced by *in vitro* or *in vivo* techniques well known in the art. For production of polyclonal antibodies, an appropriate target immune system, typically mouse or rabbit, is selected. Substantially purified antigen is presented to the immune system in a fashion determined by methods appropriate for the animal and by other parameters well known to immunologists. Typical sites for injection are in footpads, intramuscularly, intraperitoneally, or intradermally. Of course, other species may be substituted for mouse or rabbit. Polyclonal antibodies are then purified using techniques known in the art, adjusted for the desired specificity.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

14

An immunological response is usually assayed with an immunoassay. Normally, such immunoassays involve some purification of a source of antigen, for example, that produced by the same cells and in the same fashion as the antigen. A variety of immunoassay methods are well known in the art. See, e.g., Harlow and Lane, 1988, or Goding, 1986.

5 Monoclonal antibodies with affinities of  $10^8 \text{ M}^{-1}$  or preferably  $10^9$  to  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  or stronger will typically be made by standard procedures as described, e.g., in Harlow and Lane, 1988 or Goding, 1986. Briefly, appropriate animals will be selected and the desired immunization protocol followed. After the appropriate period of time, the spleens of such animals are excised and individual spleen cells fused, typically, to immortalized myeloma cells under appropriate  
10 selection conditions. Thereafter, the cells are clonally separated and the supernatants of each clone tested for their production of an appropriate antibody specific for the desired region of the antigen.

Other suitable techniques involve *in vitro* exposure of lymphocytes to the antigenic polypeptides, or alternatively, to selection of libraries of antibodies in phage or similar vectors.  
15 See Huse et al., 1989. The polypeptides and antibodies of the present invention may be used with or without modification. Frequently, polypeptides and antibodies will be labeled by joining, either covalently or non-covalently, a substance which provides for a detectable signal. A wide variety of labels and conjugation techniques are known and are reported extensively in both the scientific and patent literature. Suitable labels include radionuclides, enzymes, substrates,  
20 cofactors, inhibitors, fluorescent agents, chemiluminescent agents, magnetic particles and the like. Patents teaching the use of such labels include U.S. Patents 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 and 4,366,241. Also, recombinant immunoglobulins may be produced (see U.S. Patent 4,816,567).

"**Binding partner**" refers to a molecule capable of binding a ligand molecule with high  
25 specificity, as for example, an antigen and an antigen-specific antibody or an enzyme and its inhibitor. In general, the specific binding partners must bind with sufficient affinity to immobilize the analyte copy/complementary strand duplex (in the case of polynucleotide hybridization) under the isolation conditions. Specific binding partners are known in the art and include, for example, biotin and avidin or streptavidin, IgG and protein A, the numerous, known  
30 receptor-ligand couples, and complementary polynucleotide strands. In the case of complementary polynucleotide binding partners, the partners are normally at least about 15 bases

WO 02/08381

PCT/US01/22639

15

in length, and may be at least 40 bases in length. It is well recognized by those of skill in the art that lengths shorter than 15 (e.g., 8 bases), between 15 and 40, and greater than 40 bases may also be used. The polynucleotides may be composed of DNA, RNA, or synthetic nucleotide analogs. Further binding partners can be identified using, e.g., the two-hybrid yeast screening assay as described herein.

A **"biological sample"** refers to a sample of tissue or fluid suspected of containing an analyte polynucleotide or polypeptide from an individual including, but not limited to, e.g., plasma, serum, spinal fluid, lymph fluid, the external sections of the skin, respiratory, intestinal, and genitourinary tracts, tears, saliva, blood cells, tumors, organs, tissue and samples of *in vitro* cell culture constituents.

**"Encode"**. A polynucleotide is said to "encode" a polypeptide if, in its native state or when manipulated by methods well known to those skilled in the art, it can be transcribed and/or translated to produce the mRNA for and/or the polypeptide or a fragment thereof. The anti-sense strand is the complement of such a nucleic acid, and the encoding sequence can be deduced therefrom.

**"Isolated" or "substantially pure"**. An "isolated" or "substantially pure" nucleic acid (e.g., an RNA, DNA or a mixed polymer) is one which is substantially separated from other cellular components which naturally accompany a native human sequence or protein, e.g., ribosomes, polymerases, many other human genome sequences and proteins. The term embraces a nucleic acid sequence or protein which has been removed from its naturally occurring environment, and includes recombinant or cloned DNA isolates and chemically synthesized analogs or analogs biologically synthesized by heterologous systems.

**"SCN5A Allele"** refers, respectively, to normal alleles of the SCN5A locus as well as alleles of *SCN5A* carrying variations that cause predisposition to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation.

**"SCN5A Locus", "SCN5A Gene", "SCN5A Nucleic Acids" or "SCN5A Polynucleotide"** each refer to polynucleotides, all of which are in the *SCN5A* region, respectively, that are likely to be expressed in normal tissue, certain alleles of which result in drug-induced predisposition to *torsade de pointes* and ventricular fibrillation. The *SCN5A* locus is intended to include coding sequences, intervening sequences and regulatory elements

WO 02/08381

PCT/US01/22639

16

controlling transcription and/or translation. The *SCN5A* locus is intended to include all allelic variations of the DNA sequence.

These terms, when applied to a nucleic acid, refer to a nucleic acid which encodes a human *SCN5A* polypeptide, fragment, homolog or variant, including, e.g., protein fusions or deletions. The nucleic acids of the present invention will possess a sequence which is either derived from, or substantially similar to a natural *SCN5A*-encoding gene or one having substantial homology with a natural *SCN5A*-encoding gene or a portion thereof.

The *SCN5A* gene or nucleic acid includes normal alleles of the *SCN5A* gene including silent alleles having no effect on the amino acid sequence of the *SCN5A* polypeptide as well as alleles leading to amino acid sequence variants of the *SCN5A* polypeptide that do not substantially affect its function. These terms also include alleles having one or more mutations which adversely affect the function of the *SCN5A* polypeptide. A mutation may be a change in the *SCN5A* nucleic acid sequence which produces a deleterious change in the amino acid sequence of the *SCN5A* polypeptide, resulting in partial or complete loss of *SCN5A* function or may be a change in the nucleic acid sequence which results in the loss of effective *SCN5A* expression or the production of aberrant forms of the *SCN5A* polypeptide.

The *SCN5A* nucleic acid may be that of SEQ ID NO:1 (wild-type) or it may be an allele as that of SEQ ID NO:3 (mutant) which includes the specific mutation which predisposes one to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation.

Nucleic acid according to the present invention may include a sequence different from the sequences shown as SEQ ID NOs:1 and 3 yet encode a polypeptide with the same amino acid sequence as shown as SEQ ID NOs:2 and 4. That is, nucleic acids of the present invention include sequences which are degenerate as a result of the genetic code.

The *SCN5A* gene also refers to (a) any DNA sequence that (i) hybridizes to the complement of the DNA sequences that encode the amino acid sequence set forth by SEQ ID NOs:1 and 3 under highly stringent conditions (Ausubel et al., 1992) and (ii) encodes a gene product functionally equivalent to that of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4, or (b) any DNA sequence that (i) hybridizes to the complement of the DNA sequences that encode one of the amino acid sequences set forth by SEQ ID NOs:2 and 4 under less stringent conditions, such as moderately stringent conditions (Ausubel et al., 1992) and (ii) encodes a gene product

WO 02/08381

PCT/US01/22639

17

functionally equivalent to SCNSA as shown by SEQ ID NO:2 or 4. The invention also includes nucleic acid molecules that are the complements of the sequences described herein.

The polynucleotide compositions of this invention include RNA, cDNA, genomic DNA, synthetic forms, and mixed polymers, both sense and antisense strands, and may be chemically or biochemically modified or may contain non-natural or derivatized nucleotide bases, as will be readily appreciated by those skilled in the art. Such modifications include, for example, labels, methylation, substitution of one or more of the naturally occurring nucleotides with an analog, internucleotide modifications such as uncharged linkages (e.g., methyl phosphonates, phosphotriesters, phosphoramidates, carbamates, etc.), charged linkages (e.g., phosphorothioates, phosphorodithioates, etc.), pendent moieties (e.g., polypeptides), intercalators (e.g., acridine, psoralen, etc.), chelators, alkylators, and modified linkages (e.g., alpha anomeric nucleic acids, etc.). Also included are synthetic molecules that mimic polynucleotides in their ability to bind to a designated sequence via hydrogen bonding and other chemical interactions. Such molecules are known in the art and include, for example, those in which peptide linkages substitute for phosphate linkages in the backbone of the molecule.

The present invention provides recombinant nucleic acids comprising all or part of the SCNSA region. The recombinant construct may be capable of replicating autonomously in a host cell. Alternatively, the recombinant construct may become integrated into the chromosomal DNA of the host cell. Such a recombinant polynucleotide comprises a polynucleotide of genomic, cDNA, semi-synthetic, or synthetic origin which, by virtue of its origin or manipulation, 1) is not associated with all or a portion of a polynucleotide with which it is associated in nature; 2) is linked to a polynucleotide other than that to which it is linked in nature; or 3) does not occur in nature. Where nucleic acid according to the invention includes RNA, reference to the sequence shown should be construed as reference to the RNA equivalent, with U substituted for T.

Therefore, recombinant nucleic acids comprising sequences otherwise not naturally occurring are provided by this invention. Although the wild-type sequence may be employed, it will often be altered, e.g., by deletion, substitution or insertion. cDNA or genomic libraries of various types may be screened as natural sources of the nucleic acids of the present invention, or such nucleic acids may be provided by amplification of sequences resident in genomic DNA or other natural sources, e.g., by PCR. The choice of cDNA libraries normally corresponds to

WO 02/08381

PCT/US01/22639

18

a tissue source which is abundant in mRNA for the desired proteins. Phage libraries are normally preferred, but other types of libraries may be used. Clones of a library are spread onto plates, transferred to a substrate for screening, denatured and probed for the presence of desired sequences.

5 The DNA sequences used in this invention will usually comprise at least about five codons (15 nucleotides), more usually at least about 7-15 codons, and most preferably, at least about 35 codons. One or more introns may also be present. This number of nucleotides is usually about the minimal length required for a successful probe that would hybridize specifically with an SCN5A-encoding sequence. In this context, oligomers of as low as 8  
10 nucleotides, more generally 8-17 nucleotides, can be used for probes, especially in connection with chip technology.

Techniques for nucleic acid manipulation are described generally, for example, in Sambrook et al., 1989 or Ausubel et al., 1992. Reagents useful in applying such techniques, such as restriction enzymes and the like, are widely known in the art and commercially available from  
15 such vendors as New England BioLabs, Boehringer Mannheim, Amersham, Promega, U. S. Biochemicals, New England Nuclear, and a number of other sources. The recombinant nucleic acid sequences used to produce fusion proteins of the present invention may be derived from natural or synthetic sequences. Many natural gene sequences are obtainable from various cDNA or from genomic libraries using appropriate probes. See, GenBank, National Institutes of Health.

20 As used herein, a "portion" of the *SCN5A* locus or region or allele is defined as having a minimal size of at least about eight nucleotides, or preferably about 15 nucleotides, or more preferably at least about 25 nucleotides, and may have a minimal size of at least about 40 nucleotides. This definition includes all sizes in the range of 8-40 nucleotides as well as greater than 40 nucleotides. Thus, this definition includes nucleic acids of 8, 12, 15, 20, 25, 40, 60, 80,  
25 100, 200, 300, 400, 500 nucleotides, or nucleic acids having any number of nucleotides within these ranges of values (e.g., 9, 10, 11, 16, 23, 30, 38, 50, 72, 121, etc., nucleotides), or nucleic acids having more than 500 nucleotides. The present invention includes all novel nucleic acids having at least 8 nucleotides derived from SEQ ID NO:1 or 3, its complement or functionally equivalent nucleic acid sequences. The present invention does not include nucleic acids which  
30 exist in the prior art. That is, the present invention includes all nucleic acids having at least 8

WO 02/08381

PCT/US01/22639

19

nucleotides derived from SEQ ID NO:1 or 3 with the proviso that it does not include nucleic acids existing in the prior art.

"SCN5A protein" or "SCN5A polypeptide" refers to a protein or polypeptide encoded by the *SCN5A* locus, variants or fragments thereof. The term "polypeptide" refers to a polymer of amino acids and its equivalent and does not refer to a specific length of the product; thus, peptides, oligopeptides and proteins are included within the definition of a polypeptide. This term also does not refer to, or exclude modifications of the polypeptide, for example, glycosylations, acetylations, phosphorylations, and the like. Included within the definition are, for example, polypeptides containing one or more analogs of an amino acid (including, for example, unnatural amino acids, etc.), polypeptides with substituted linkages as well as other modifications known in the art, both naturally and non-naturally occurring. Ordinarily, such polypeptides will be at least about 50% homologous to the native SCN5A sequence, preferably in excess of about 90%, and more preferably at least about 95% homologous. Also included are proteins encoded by DNA which hybridize under high or low stringency conditions, to SCN5A-encoding nucleic acids and closely related polypeptides or proteins retrieved by antisera to the SCN5A protein.

The SCN5A polypeptide may be that shown by SEQ ID NO:2 or 4 which may be in isolated and/or purified form, free or substantially free of material with which it is naturally associated. The polypeptide may, if produced by expression in a prokaryotic cell or produced synthetically, lack native post-translational processing, such as glycosylation. Alternatively, the present invention is also directed to polypeptides which are sequence variants, alleles or derivatives of the SCN5A polypeptide. Such polypeptides may have an amino acid sequence which differs from that set forth in SEQ ID NO:2 or 4 by one or more of addition, substitution, deletion or insertion of one or more amino acids. Preferred such polypeptides have SCN5A function.

Substitutional variants typically contain the exchange of one amino acid for another at one or more sites within the protein, and may be designed to modulate one or more properties of the polypeptide, such as stability against proteolytic cleavage, without the loss of other functions or properties. Amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues involved. Preferred substitutions are ones which are conservative, that is, one amino

WO 02/08381

PCT/US01/22639

20

acid is replaced with one of similar shape and charge. Conservative substitutions are well known in the art and typically include substitutions within the following groups: glycine, alanine; valine, isoleucine, leucine; aspartic acid, glutamic acid; asparagine, glutamine; serine, threonine; lysine, arginine; and tyrosine, phenylalanine.

5 Certain amino acids may be substituted for other amino acids in a protein structure without appreciable loss of interactive binding capacity with structures such as, for example, antigen-binding regions of antibodies or binding sites on substrate molecules or binding sites on proteins interacting with the SCN5A polypeptide. Since it is the interactive capacity and nature of a protein which defines that protein's biological functional activity, certain amino acid  
10 substitutions can be made in a protein sequence, and its underlying DNA coding sequence, and nevertheless obtain a protein with like properties. In making such changes, the hydropathic index of amino acids may be considered. The importance of the hydrophobic amino acid index in conferring interactive biological function on a protein is generally understood in the art (Kyte and Doolittle, 1982). Alternatively, the substitution of like amino acids can be made effectively on  
15 the basis of hydrophilicity. The importance of hydrophilicity in conferring interactive biological function of a protein is generally understood in the art (U.S. Patent 4,554,101). The use of the hydrophobic index or hydrophilicity in designing polypeptides is further discussed in U.S. Patent 5,691,198.

20 The length of polypeptide sequences compared for homology will generally be at least about 16 amino acids, usually at least about 20 residues, more usually at least about 24 residues, typically at least about 28 residues, and preferably more than about 35 residues.

"Operably linked" refers to a juxtaposition wherein the components so described are in a relationship permitting them to function in their intended manner. For instance, a promoter is operably linked to a coding sequence if the promoter affects its transcription or expression.

25 The term **peptide mimetic** or **mimetic** is intended to refer to a substance which has the essential biological activity of the SCN5A polypeptide. A peptide mimetic may be a peptide-containing molecule that mimics elements of protein secondary structure (Johnson et al., 1993). The underlying rationale behind the use of peptide mimetics is that the peptide backbone of proteins exists chiefly to orient amino acid side chains in such a way as to facilitate molecular  
30 interactions, such as those of antibody and antigen, enzyme and substrate or scaffolding proteins. A peptide mimetic is designed to permit molecular interactions similar to the natural molecule.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

21

A mimetic may not be a peptide at all, but it will retain the essential biological activity of natural SCN5A polypeptide.

"Probes". Polynucleotide polymorphisms associated with SCN5A alleles which predispose to *torsade de pointes* and ventricular fibrillation are detected by hybridization with a polynucleotide probe which forms a stable hybrid with that of the target sequence, under stringent to moderately stringent hybridization and wash conditions. If it is expected that the probes will be perfectly complementary to the target sequence, high stringency conditions will be used. Hybridization stringency may be lessened if some mismatching is expected, for example, if variants are expected with the result that the probe will not be completely complementary. Conditions are chosen which rule out nonspecific/adventitious bindings, that is, which minimize noise. (It should be noted that throughout this disclosure, if it is simply stated that "stringent" conditions are used that it is meant to be read as "high stringency" conditions are used.) Since such indications identify neutral DNA polymorphisms as well as mutations, these indications need further analysis to demonstrate detection of an SCN5A susceptibility allele.

Probes for SCN5A alleles may be derived from the sequences of the SCN5A region, its cDNA, functionally equivalent sequences, or the complements thereof. The probes may be of any suitable length, which span all or a portion of the SCN5A region, and which allow specific hybridization to the region. If the target sequence contains a sequence identical to that of the probe, the probes may be short, e.g., in the range of about 8-30 base pairs, since the hybrid will be relatively stable under even stringent conditions. If some degree of mismatch is expected with the probe, i.e., if it is suspected that the probe will hybridize to a variant region, a longer probe may be employed which hybridizes to the target sequence with the requisite specificity.

The probes will include an isolated polynucleotide attached to a label or reporter molecule and may be used to isolate other polynucleotide sequences, having sequence similarity by standard methods. For techniques for preparing and labeling probes see, e.g., Sambrook et al., 1989 or Ausubel et al., 1992. Other similar polynucleotides may be selected by using homologous polynucleotides. Alternatively, polynucleotides encoding these or similar polypeptides may be synthesized or selected by use of the redundancy in the genetic code. Various codon substitutions may be introduced, e.g., by silent changes (thereby producing various restriction sites) or to optimize expression for a particular system. Mutations may be

WO 02/08381

PCT/US01/22639

22

introduced to modify the properties of the polypeptide, perhaps to change the polypeptide degradation or turnover rate.

Probes comprising synthetic oligonucleotides or other polynucleotides of the present invention may be derived from naturally occurring or recombinant single- or double-stranded polynucleotides, or be chemically synthesized. Probes may also be labeled by nick translation, Klenow fill-in reaction, or other methods known in the art.

Portions of the polynucleotide sequence having at least about eight nucleotides, usually at least about 15 nucleotides, and fewer than about 9 kb, usually fewer than about 1.0 kb, from a polynucleotide sequence encoding *SCN5A* are preferred as probes. This definition therefore includes probes of sizes 8 nucleotides through 9000 nucleotides. Thus, this definition includes probes of 8, 12, 15, 20, 25, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400 or 500 nucleotides or probes having any number of nucleotides within these ranges of values (e.g., 9, 10, 11, 16, 23, 30, 38, 50, 72, 121, etc., nucleotides), or probes having more than 500 nucleotides. The probes may also be used to determine whether mRNA encoding *SCN5A* is present in a cell or tissue. The present invention does not include probes which exist in the prior art. That is, the present invention includes all probes having at least 8 nucleotides derived from SEQ ID NO:1 or 3, with the proviso that they do not include probes existing in the prior art.

Similar considerations and nucleotide lengths are also applicable to primers which may be used for the amplification of all or part of the *SCN5A* gene. Thus, a definition for primers includes primers of 8, 12, 15, 20, 25, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500 nucleotides, or primers having any number of nucleotides within these ranges of values (e.g., 9, 10, 11, 16, 23, 30, 38, 50, 72, 121, etc. nucleotides), or primers having more than 500 nucleotides, or any number of nucleotides between 500 and 9000. The primers may also be used to determine whether mRNA encoding *SCN5A* is present in a cell or tissue. The present invention includes all novel primers having at least 8 nucleotides derived from the *SCN5A* locus for amplifying the *SCN5A* gene, its complement or functionally equivalent nucleic acid sequences. The present invention does not include primers which exist in the prior art. That is, the present invention includes all primers having at least 8 nucleotides with the proviso that it does not include primers existing in the prior art.

"Protein modifications or fragments" are provided by the present invention for *SCN5A* polypeptides or fragments thereof which are substantially homologous to primary structural

WO 02/08381

PCT/US01/22639

23

sequence but which include, e.g., *in vivo* or *in vitro* chemical and biochemical modifications or which incorporate unusual amino acids. Such modifications include, for example, acetylation, carboxylation, phosphorylation, glycosylation, ubiquitination, labeling, e.g., with radionuclides, and various enzymatic modifications, as will be readily appreciated by those well skilled in the art. A variety of methods for labeling polypeptides and of substituents or labels useful for such purposes are well known in the art, and include radioactive isotopes such as  $^{32}\text{P}$ , ligands which bind to labeled antigens (e.g., antibodies), fluorophores, chemiluminescent agents, enzymes, and antigens which can serve as specific binding pair members for a labeled ligand. The choice of label depends on the sensitivity required, ease of conjugation with the primer, stability requirements, and available instrumentation. Methods of labeling polypeptides are well known in the art. See Sambrook *et al.*, 1989 or Ausubel *et al.*, 1992.

Besides substantially full-length polypeptides, the present invention provides for biologically active fragments of the polypeptides. Significant biological activities include ligand-binding, immunological activity and other biological activities characteristic of SCN5A polypeptides. Immunological activities include both immunogenic function in a target immune system, as well as sharing of immunological epitopes for binding, serving as either a competitor or substitute antigen for an epitope of the SCN5A protein. As used herein, "epitope" refers to an antigenic determinant of a polypeptide. An epitope could comprise three amino acids in a spatial conformation which is unique to the epitope. Generally, an epitope consists of at least five such amino acids, and more usually consists of at least 8-10 such amino acids. Methods of determining the spatial conformation of such amino acids are known in the art.

For immunological purposes, tandem-repeat polypeptide segments may be used as immunogens, thereby producing highly antigenic proteins. Alternatively, such polypeptides will serve as highly efficient competitors for specific binding. Production of antibodies specific for SCN5A polypeptides or fragments thereof is described below.

The present invention also provides for fusion polypeptides, comprising SCN5A polypeptides and fragments. Homologous polypeptides may be fusions between two or more SCN5A polypeptide sequences or between the sequences of SCN5A and a related protein. Likewise, heterologous fusions may be constructed which would exhibit a combination of properties or activities of the derivative proteins. For example, ligand-binding or other domains may be "swapped" between different new fusion polypeptides or fragments. Such homologous

WO 02/08381

PCT/US01/22639

24

or heterologous fusion polypeptides may display, for example, altered strength or specificity of binding. Fusion partners include immunoglobulins, bacterial  $\beta$ -galactosidase, trpE, protein A,  $\beta$ -lactamase, alpha amylase, alcohol dehydrogenase and yeast alpha mating factor. See Godowski et al., 1988.

5 Fusion proteins will typically be made by either recombinant nucleic acid methods, as described below, or may be chemically synthesized. Techniques for the synthesis of polypeptides are described, for example, in Merrifield (1963).

"Protein purification" refers to various methods for the isolation of the SCN5A polypeptides from other biological material, such as from cells transformed with recombinant nucleic acids encoding SCN5A, and are well known in the art. For example, such polypeptides may be purified by immunoaffinity chromatography employing, e.g., the antibodies provided by the present invention. Various methods of protein purification are well known in the art, and include those described in Deutscher, 1990 and Scopes, 1982.

15 The terms "isolated", "substantially pure", and "substantially homogeneous" are used interchangeably to describe a protein or polypeptide which has been separated from components which accompany it in its natural state. A monomeric protein is substantially pure when at least about 60 to 75% of a sample exhibits a single polypeptide sequence. A substantially pure protein will typically comprise about 60 to 90% W/W of a protein sample, more usually about 95%, and preferably will be over about 99% pure. Protein purity or homogeneity may be indicated by a number of means well known in the art, such as polyacrylamide gel electrophoresis of a protein sample, followed by visualizing a single polypeptide band upon staining the gel. For certain purposes, higher resolution may be provided by using HPLC or other means well known in the art which are utilized for purification.

25 An SCN5A protein is substantially free of naturally associated components when it is separated from the native contaminants which accompany it in its natural state. Thus, a polypeptide which is chemically synthesized or synthesized in a cellular system different from the cell from which it naturally originates will be substantially free from its naturally associated components. A protein may also be rendered substantially free of naturally associated components by isolation, using protein purification techniques well known in the art.

30 A polypeptide produced as an expression product of an isolated and manipulated genetic sequence is an "isolated polypeptide", as used herein, even if expressed in a homologous cell

WO 02/08381

PCT/US01/22639

25

type. Synthetically made forms or molecules expressed by heterologous cells are inherently isolated molecules.

"**Recombinant nucleic acid**" is a nucleic acid which is not naturally occurring, or which is made by the artificial combination of two otherwise separated segments of sequence. This artificial combination is often accomplished by either chemical synthesis means, or by the artificial manipulation of isolated segments of nucleic acids, e.g., by genetic engineering techniques. Such is usually done to replace a codon with a redundant codon encoding the same or a conservative amino acid, while typically introducing or removing a sequence recognition site. Alternatively, it is performed to join together nucleic acid segments of desired functions to generate a desired combination of functions.

"**Regulatory sequences**" refers to those sequences normally within 100 kb of the coding region of a locus, but they may also be more distant from the coding region, which affect the expression of the gene (including transcription of the gene, and translation, splicing, stability or the like of the messenger RNA).

"**Substantial homology or similarity**". A nucleic acid or fragment thereof is "substantially homologous" ("or substantially similar") to another if, when optimally aligned (with appropriate nucleotide insertions or deletions) with the other nucleic acid (or its complementary strand), there is nucleotide sequence identity in at least about 60% of the nucleotide bases, usually at least about 70%, more usually at least about 80%, preferably at least about 90%, and more preferably at least about 95-98% of the nucleotide bases.

To determine homology between two different nucleic acids, the percent homology is to be determined using the BLASTN program "BLAST 2 sequences". This program is available for public use from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) over the Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>) (Altschul et al., 1997). The parameters to be used are whatever combination of the following yields the highest calculated percent homology (as calculated below) with the default parameters shown in parentheses:

Program - blastn

Matrix - 0 BLOSUM62

Reward for a match - 0 or 1 (1)

Penalty for a mismatch - 0, -1, -2 or -3 (-2)

Open gap penalty - 0, 1, 2, 3, 4 or 5 (5)

WO 02/08381

PCT/US01/22639

26

Extension gap penalty - 0 or 1 (1)

Gap x\_dropoff - 0 or 50 (50)

Expect - 10

Along with a variety of other results, this program shows a percent identity across the complete strands or across regions of the two nucleic acids being matched. The program shows as part of the results an alignment and identity of the two strands being compared. If the strands are of equal length then the identity will be calculated across the complete length of the nucleic acids. If the strands are of unequal lengths, then the length of the shorter nucleic acid is to be used. If the nucleic acids are quite similar across a portion of their sequences but different across the rest of their sequences, the blastn program "BLAST 2 Sequences" will show an identity across only the similar portions, and these portions are reported individually. For purposes of determining homology herein, the percent homology refers to the shorter of the two sequences being compared. If any one region is shown in different alignments with differing percent identities, the alignments which yield the greatest homology are to be used. The averaging is to be performed as in this example of SEQ ID NOs:5 and 6.

5'-ACCGTAGCTACGTACGTATATAGAAAGGGCGCGATCGTCGTCGCGTATGACGAC  
TTAGCATGC-3' (SEQ ID NO:5)  
5'-ACCGGTAGCTACGTACGTTATTAGAAAGGGGTGTGTGTGTGTGTAAACCGGG  
GTTTTCGGGATCGTCCGTCGCGTATGACGACTTAGCCATGCACGATATATCGTAT  
TAGGACTAGCGATTGACTAG-3' (SEQ ID NO:6)

The program "BLAST 2 Sequences" shows differing alignments of these two nucleic acids depending upon the parameters which are selected. As examples, four sets of parameters were selected for comparing SEQ ID NOs:5 and 6 (gap x\_dropoff was 50 for all cases), with the results shown in Table 1. It is to be noted that none of the sets of parameters selected as shown in Table 1 is necessarily the best set of parameters for comparing these sequences. The percent homology is calculated by multiplying for each region showing identity the fraction of bases of the shorter strand within a region times the percent identity for that region and adding all of these together. For example, using the first set of parameters shown in Table 1, SEQ ID NO:5 is the short sequence (63 bases), and two regions of identity are shown, the first encompassing bases 4-29 (26 bases) of SEQ ID NO:5 with 92% identity to SEQ ID NO:6 and the second encompassing bases 39-59 (21 bases) of SEQ ID NO:5 with 100% identity to SEQ ID NO:6.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

27

Bases 1-3, 30-38 and 60-63 (16 bases) are not shown as having any identity with SEQ ID NO:6. Percent homology is calculated as:  $(26/63)(92) + (21/63)(100) + (16/63)(0) = 71.3\%$  homology. The percents of homology calculated using each of the four sets of parameters shown are listed in Table 1. Several other combinations of parameters are possible, but they are not listed for the sake of brevity. It is seen that each set of parameters resulted in a different calculated percent homology. Because the result yielding the highest percent homology is to be used, based solely on these four sets of parameters one would state that SEQ ID NOs:5 and 6 have 87.1% homology. Again it is to be noted that use of other parameters may show an even higher homology for SEQ ID NOs:5 and 6, but for brevity not all the possible results are shown.

TABLE 1

| Parameter Values |          |          |               | Regions of identity (%)             |                                        | Homology |
|------------------|----------|----------|---------------|-------------------------------------|----------------------------------------|----------|
| Match            | Mismatch | Open Gap | Extension Gap |                                     |                                        |          |
| 1                | -2       | 5        | 1             | 4-29 of 5 and<br>5-31 of 6 (92%)    | 39-59 of 5 and<br>71-91 of 6<br>(100%) | 71.3     |
| 1                | -2       | 2        | 1             | 4-29 of 5 and<br>5-31 of 6 (92%)    | 33-63 of 5 and<br>64-96 of 6<br>(93%)  | 83.7     |
| 1                | -1       | 5        | 1             | -----                               | 30-59 of 5 and<br>61-91 of 6<br>(93%)  | 44.3     |
| 1                | -1       | 2        | 1             | 4-29 of 5 and<br>5-31 of 6<br>(92%) | 30-63 of 5 and<br>61-96 of 6<br>(91%)  | 87.1     |

Alternatively, substantial homology or (similarity) exists when a nucleic acid or fragment thereof will hybridize to another nucleic acid (or a complementary strand thereof) under selective hybridization conditions, to a strand, or to its complement. Selectivity of hybridization exists when hybridization which is substantially more selective than total lack of specificity occurs.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

28

Typically, selective hybridization will occur when there is at least about 55% homology over a stretch of at least about 14 nucleotides, preferably at least about 65%, more preferably at least about 75%, and most preferably at least about 90%. See, Kanehisa, 1984. The length of homology comparison, as described, may be over longer stretches, and in certain embodiments will often be over a stretch of at least about nine nucleotides, usually at least about 20

nucleotides, more usually at least about 24 nucleotides, typically at least about 28 nucleotides, more typically at least about 32 nucleotides, and preferably at least about 36 or more nucleotides.

Nucleic acid hybridization will be affected by such conditions as salt concentration, temperature, or organic solvents, in addition to the base composition, length of the complementary strands, and the number of nucleotide base mismatches between the hybridizing nucleic acids, as will be readily appreciated by those skilled in the art. Stringent temperature conditions will generally include temperatures in excess of 30°C, typically in excess of 37°C, and preferably in excess of 45°C. Stringent salt conditions will ordinarily be less than 1000 mM, typically less than 500 mM, and preferably less than 200 mM. However, the combination of parameters is much more important than the measure of any single parameter. The stringency conditions are dependent on the length of the nucleic acid and the base composition of the nucleic acid and can be determined by techniques well known in the art. See, e.g., Wetmur and Davidson, 1968.

Probe sequences may also hybridize specifically to duplex DNA under certain conditions to form triplex or other higher order DNA complexes. The preparation of such probes and suitable hybridization conditions are well known in the art.

The terms "**substantial homology**" or "**substantial identity**", when referring to polypeptides, indicate that the polypeptide or protein in question exhibits at least about 30% identity with an entire naturally-occurring protein or a portion thereof, usually at least about 70% identity, more usually at least about 80% identity, preferably at least about 90% identity, and more preferably at least about 95% identity.

Homology, for polypeptides, is typically measured using sequence analysis software. See, e.g., the Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 910 University Avenue, Madison, Wisconsin 53705. Protein analysis software matches similar sequences using measures of homology assigned to various substitutions, deletions and other modifications. Conservative substitutions typically

WO 02/08381

PCT/US01/22639

29

include substitutions within the following groups: glycine, alanine; valine, isoleucine, leucine; aspartic acid, glutamic acid; asparagine, glutamine; serine, threonine; lysine, arginine; and phenylalanine, tyrosine.

"**Substantially similar function**" refers to the function of a modified nucleic acid or a modified protein, with reference to the wild-type *SCN5A* nucleic acid or wild-type *SCN5A* polypeptide. The modified polypeptide will be substantially homologous to the wild-type *SCN5A* polypeptide and will have substantially the same function. The modified polypeptide may have an altered amino acid sequence and/or may contain modified amino acids. In addition to the similarity of function, the modified polypeptide may have other useful properties, such as a longer half-life. The similarity of function (activity) of the modified polypeptide may be substantially the same as the activity of the wild-type *SCN5A* polypeptide. Alternatively, the similarity of function (activity) of the modified polypeptide may be higher than the activity of the wild-type *SCN5A* polypeptide. The modified polypeptide is synthesized using conventional techniques, or is encoded by a modified nucleic acid and produced using conventional techniques. The modified nucleic acid is prepared by conventional techniques. A nucleic acid with a function substantially similar to the wild-type *SCN5A* gene function produces the modified protein described above.

A polypeptide "**fragment**", "**portion**" or "**segment**" is a stretch of amino acid residues of at least about five to seven contiguous amino acids, often at least about seven to nine contiguous amino acids, typically at least about nine to 13 contiguous amino acids and, most preferably, at least about 20 to 30 or more contiguous amino acids.

The polypeptides of the present invention, if soluble, may be coupled to a solid-phase support, e.g., nitrocellulose, nylon, column packing materials (e.g., Sepharose beads), magnetic beads, glass wool, plastic, metal, polymer gels, cells, or other substrates. Such supports may take the form, for example, of beads, wells, dipsticks, or membranes.

"**Target region**" refers to a region of the nucleic acid which is amplified and/or detected. The term "**target sequence**" refers to a sequence with which a probe or primer will form a stable hybrid under desired conditions.

The practice of the present invention employs, unless otherwise indicated, conventional techniques of chemistry, molecular biology, microbiology, recombinant DNA, genetics, and immunology. See, e.g., Maniatis et al., 1982; Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1992;

WO 02/08381

PCT/US01/22639

30

Glover, 1985; Anand, 1992; Guthrie and Fink, 1991. A general discussion of techniques and materials for human gene mapping, including mapping of human chromosome 1, is provided, e.g., in White and Lalouel, 1988.

5     Preparation of recombinant or chemically synthesized  
      nucleic acids; vectors, transformation, host cells

      Large amounts of the polynucleotides of the present invention may be produced by replication in a suitable host cell. Natural or synthetic polynucleotide fragments coding for a desired fragment will be incorporated into recombinant polynucleotide constructs, usually DNA  
10     constructs, capable of introduction into and replication in a prokaryotic or eukaryotic cell. Usually the polynucleotide constructs will be suitable for replication in a unicellular host, such as yeast or bacteria, but may also be intended for introduction to (with and without integration within the genome) cultured mammalian or plant or other eukaryotic cell lines. The purification of nucleic acids produced by the methods of the present invention are described, e.g., in  
15     Sambrook et al., 1989 or Ausubel et al., 1992.

      The polynucleotides of the present invention may also be produced by chemical synthesis, e.g., by the phosphoramidite method described by Beaucage and Caruthers (1981) or the triester method according to Matteucci and Caruthers (1981) and may be performed on commercial, automated oligonucleotide synthesizers. A double-stranded fragment may be  
20     obtained from the single-stranded product of chemical synthesis either by synthesizing the complementary strand and annealing the strand together under appropriate conditions or by adding the complementary strand using DNA polymerase with an appropriate primer sequence.

      Polynucleotide constructs prepared for introduction into a prokaryotic or eukaryotic host may comprise a replication system recognized by the host, including the intended polynucleotide  
25     fragment encoding the desired polypeptide, and will preferably also include transcription and translational initiation regulatory sequences operably linked to the polypeptide encoding segment. Expression vectors may include, for example, an origin of replication or autonomously replicating sequence (ARS) and expression control sequences, a promoter, an enhancer and necessary processing information sites, such as ribosome-binding sites, RNA splice sites,  
30     polyadenylation sites, transcriptional terminator sequences, and mRNA stabilizing sequences.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

31

Such vectors may be prepared by means of standard recombinant techniques well known in the art and discussed, for example, in Sambrook et al., 1989 or Ausubel et al., 1992.

An appropriate promoter and other necessary vector sequences will be selected so as to be functional in the host, and may include, when appropriate, those naturally associated with the *SCN5A* gene. Examples of workable combinations of cell lines and expression vectors are described in Sambrook et al., 1989 or Ausubel et al., 1992; see also, e.g., Metzger et al., 1988. Many useful vectors are known in the art and may be obtained from such vendors as Stratagene, New England Biolabs, Promega Biotech, and others. Promoters such as the *trp*, *lac* and phage promoters, tRNA promoters and glycolytic enzyme promoters may be used in prokaryotic hosts. Useful yeast promoters include promoter regions for metallothionein, 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes such as enolase or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, enzymes responsible for maltose and galactose utilization, and others. Vectors and promoters suitable for use in yeast expression are further described in Hitzeman et al., EP 73,675A. Appropriate non-native mammalian promoters might include the early and late promoters from SV40 (Fiers et al., 1978) or promoters derived from murine Molony leukemia virus, mouse tumor virus, avian sarcoma viruses, adenovirus II, bovine papilloma virus or polyoma. Insect promoters may be derived from baculovirus. In addition, the construct may be joined to an amplifiable gene (e.g., DHFR) so that multiple copies of the gene may be made. For appropriate enhancer and other expression control sequences, see also Enhancers and Eukaryotic Gene Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1983). See also, e.g., U.S. Patent Nos. 5,691,198; 5,735,500; 5,747,469 and 5,436,146.

While such expression vectors may replicate autonomously, they may also replicate by being inserted into the genome of the host cell, by methods well known in the art.

Expression and cloning vectors will likely contain a selectable marker, a gene encoding a protein necessary for survival or growth of a host cell transformed with the vector. The presence of this gene ensures growth of only those host cells which express the inserts. Typical selection genes encode proteins that a) confer resistance to antibiotics or other toxic substances, e.g. ampicillin, neomycin, methotrexate, etc., b) complement auxotrophic deficiencies, or c) supply critical nutrients not available from complex media, e.g., the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli*. The choice of the proper selectable marker will depend on the host cell, and appropriate markers for different hosts are well known in the art.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

32

The vectors containing the nucleic acids of interest can be transcribed *in vitro*, and the resulting RNA introduced into the host cell by well-known methods, e.g., by injection (see, Kubo et al., 1988), or the vectors can be introduced directly into host cells by methods well known in the art, which vary depending on the type of cellular host, including electroporation; transfection employing calcium chloride, rubidium chloride calcium phosphate, DEAE-dextran, or other substances; microprojectile bombardment; lipofection; infection (where the vector is an infectious agent, such as a retroviral genome); and other methods. See generally, Sambrook et al., 1989 and Ausubel et al., 1992. The introduction of the polynucleotides into the host cell by any method known in the art, including, *inter alia*, those described above, will be referred to herein as "transformation." The cells into which have been introduced nucleic acids described above are meant to also include the progeny of such cells.

Large quantities of the nucleic acids and polypeptides of the present invention may be prepared by expressing the *SCN5A* nucleic acid or portions thereof in vectors or other expression vehicles in compatible prokaryotic or eukaryotic host cells. The most commonly used prokaryotic hosts are strains of *Escherichia coli*, although other prokaryotes, such as *Bacillus subtilis* or *Pseudomonas* may also be used.

Mammalian or other eukaryotic host cells, such as those of yeast, filamentous fungi, plant, insect, or amphibian or avian species, may also be useful for production of the proteins of the present invention. Propagation of mammalian cells in culture is *per se* well known. See, Jakoby and Pastan (eds.) (1979). Examples of commonly used mammalian host cell lines are VERO and HeLa cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, and WI38, BHK, and COS cell lines, although it will be appreciated by the skilled practitioner that other cell lines may be appropriate, e.g., to provide higher expression, desirable glycosylation patterns, or other features. An example of a commonly used insect cell line is SF9.

Clones are selected by using markers depending on the mode of the vector construction. The marker may be on the same or a different DNA molecule, preferably the same DNA molecule. In prokaryotic hosts, the transformant may be selected, e.g., by resistance to ampicillin, tetracycline or other antibiotics. Production of a particular product based on temperature sensitivity may also serve as an appropriate marker.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

33

Prokaryotic or eukaryotic cells transformed with the polynucleotides of the present invention will be useful not only for the production of the nucleic acids and polypeptides of the present invention, but also, for example, in studying the characteristics of SCN5A polypeptides.

5 The probes and primers based on the *SCN5A* gene sequences disclosed herein are used to identify homologous *SCN5A* gene sequences and proteins in other species. These gene sequences and proteins are used in the diagnostic/prognostic, therapeutic and drug screening methods described herein for the species from which they have been isolated.

#### Methods of Use: Drug Screening

10 The invention is particularly useful for screening compounds by using SCN5A proteins in transformed cells, transfected oocytes or transgenic animals. Since mutations in the SCN5A protein can alter the functioning of the cardiac sodium channel, candidate drugs are screened for effects on the channel using cells containing either a normal SCN5A protein or a mutant SCN5A protein. The drug is added to the cells in culture or administered to a transgenic animal and the  
15 effect on the induced current of the wild-type sodium channel is compared to the induced current of a cell or animal containing the mutant sodium channel. Drug candidates which alter the induced current to a more normal level are useful for treating or preventing drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation. The same type of experiments are performed to screen drugs, not for their ability to treat or prevent drug-induced *torsade de pointes* and ventricular  
20 fibrillation, but rather to determine whether a drug is one which may induce *torsade de pointes* and ventricular fibrillation. If addition of a drug to cells or an animal expressing a mutant SCN5A results in an induced Na<sup>+</sup> current different from that in the absence of the drug, the drug is one which may induce *torsade de pointes* and ventricular fibrillation in persons with the mutation. Similar studies may be performed on cells or animals expressing wild-type SCN5A  
25 to determine whether the test drug has a similar effect on the induced Na<sup>+</sup> current in wild-type cells or animals. If a similar effect is seen then persons with the mutant SCN5A are at no greater risk than are persons with wild-type SCN5A, but if the induced current in drug-treated mutant cells or animals differs by a greater amount than that in drug-treated wild-type cells or animals from the non-drug-treated cells or animals, then persons with the mutation are at greater risk of  
30 having the drug induce *torsade de pointes* and ventricular fibrillation.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

34

This invention is particularly useful for screening compounds by using the SCN5A polypeptide or binding fragment thereof in any of a variety of drug screening techniques.

The SCN5A polypeptide or fragment employed in such a test may either be free in solution, affixed to a solid support, or borne on a cell surface. One method of drug screening utilizes eucaryotic or procaryotic host cells which are stably transformed with recombinant polynucleotides expressing the polypeptide or fragment, preferably in competitive binding assays. Such cells, either in viable or fixed form, can be used for standard binding assays. One may measure, for example, for the formation of complexes between an SCN5A polypeptide or fragment and the agent being tested, or examine the degree to which the formation of a complex between an SCN5A polypeptide or fragment and a known ligand is interfered with by the agent being tested.

Thus, the present invention provides methods of screening for drugs comprising contacting such an agent with an SCN5A polypeptide or fragment thereof and assaying (i) for the presence of a complex between the agent and the SCN5A polypeptide or fragment, or (ii) for the presence of a complex between the SCN5A polypeptide or fragment and a ligand, by methods well known in the art. In such competitive binding assays the SCN5A polypeptide or fragment is typically labeled. Free SCN5A polypeptide or fragment is separated from that present in a protein:protein complex, and the amount of free (i.e., uncomplexed) label is a measure of the binding of the agent being tested to SCN5A or its interference with SCN5A:ligand binding, respectively. One may also measure the amount of bound, rather than free, SCN5A. It is also possible to label the ligand rather than the SCN5A and to measure the amount of ligand binding to SCN5A in the presence and in the absence of the drug being tested.

Another technique for drug screening provides high throughput screening for compounds having suitable binding affinity to the SCN5A polypeptides and is described in detail in Geysen (published PCT application WO 84/03564). Briefly stated, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The peptide test compounds are reacted with SCN5A polypeptide and washed. Bound SCN5A polypeptide is then detected by methods well known in the art.

Purified SCN5A can be coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. However, non-neutralizing antibodies to the polypeptide can be used to capture antibodies to immobilize the SCN5A polypeptide on the solid phase.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

35

This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralizing antibodies capable of specifically binding the SCN5A polypeptide compete with a test compound for binding to the SCN5A polypeptide or fragments thereof. In this manner, the antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants of the SCN5A polypeptide.

The polypeptide of the invention may also be used for screening compounds developed as a result of combinatorial library technology. Combinatorial library technology provides an efficient way of testing a potential vast number of different substances for ability to modulate activity of a polypeptide. Such libraries and their use are known in the art. The use of peptide libraries is preferred. See, for example, WO 97/02048.

Briefly, a method of screening for a substance which modulates activity of a polypeptide may include contacting one or more test substances with the polypeptide in a suitable reaction medium, testing the activity of the treated polypeptide and comparing that activity with the activity of the polypeptide in comparable reaction medium untreated with the test substance or substances. A difference in activity between the treated and untreated polypeptides is indicative of a modulating effect of the relevant test substance or substances.

Prior to, or as well as being screened for modulation of activity, test substances may be screened for ability to interact with the polypeptide, e.g., in a yeast two-hybrid system (e.g., Bartel et al., 1993; Fields and Song, 1989; Chevray and Nathans, 1992; Lee et al., 1995). This system may be used as a coarse screen prior to testing a substance for actual ability to modulate activity of the polypeptide. Alternatively, the screen could be used to screen test substances for binding to an SCN5A specific binding partner, or to find mimetics of the SCN5A polypeptide.

Following identification of a substance which modulates or affects polypeptide activity, the substance may be further investigated. Furthermore, it may be manufactured and/or used in preparation, i.e., manufacture or formulation, or a composition such as a medicament, pharmaceutical composition or drug. These may be administered to individuals.

Thus, the present invention extends in various aspects not only to a substance identified using a nucleic acid molecule as a modulator of polypeptide activity, in accordance with what is disclosed herein, but also a pharmaceutical composition, medicament, drug or other composition comprising such a substance, a method comprising administration of such a composition comprising such a substance, a method comprising administration of such a

WO 02/08381

PCT/US01/22639

36

composition to a patient, e.g., for treatment (which may include preventative treatment) of drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation, use of such a substance in the manufacture of a composition for administration, e.g., for treatment of drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation, and a method of making a pharmaceutical composition comprising  
5 admixing such a substance with a pharmaceutically acceptable excipient, vehicle or carrier, and optionally other ingredients.

A substance identified as a modulator of polypeptide function may be peptide or non-peptide in nature. Non-peptide "small molecules" are often preferred for many *in vivo* pharmaceutical uses. Accordingly, a mimetic or mimic of the substance (particularly if a  
10 peptide) may be designed for pharmaceutical use.

The designing of mimetics to a known pharmaceutically active compound is a known approach to the development of pharmaceuticals based on a "lead" compound. This might be desirable where the active compound is difficult or expensive to synthesize or where it is unsuitable for a particular method of administration, e.g., pure peptides are unsuitable active  
15 agents for oral compositions as they tend to be quickly degraded by proteases in the alimentary canal. Mimetic design, synthesis and testing is generally used to avoid randomly screening large numbers of molecules for a target property.

There are several steps commonly taken in the design of a mimetic from a compound having a given target property. First, the particular parts of the compound that are critical and/or  
20 important in determining the target property are determined. In the case of a peptide, this can be done by systematically varying the amino acid residues in the peptide, e.g., by substituting each residue in turn. Alanine scans of peptide are commonly used to refine such peptide motifs. These parts or residues constituting the active region of the compound are known as its "pharmacophore".

Once the pharmacophore has been found, its structure is modeled according to its physical properties, e.g., stereochemistry, bonding, size and/or charge, using data from a range of sources, e.g., spectroscopic techniques, x-ray diffraction data and NMR. Computational analysis, similarity mapping (which models the charge and/or volume of a pharmacophore, rather than the bonding between atoms) and other techniques can be used in this modeling process.  
25

In a variant of this approach, the three-dimensional structure of the ligand and its binding partner are modeled. This can be especially useful where the ligand and/or binding partner  
30

WO 02/08381

PCT/US01/22639

37

change conformation on binding, allowing the model to take account of this in the design of the mimetic.

A template molecule is then selected onto which chemical groups which mimic the pharmacophore can be grafted. The template molecule and the chemical groups grafted onto it can conveniently be selected so that the mimetic is easy to synthesize, is likely to be pharmacologically acceptable, and does not degrade *in vivo*, while retaining the biological activity of the lead compound. Alternatively, where the mimetic is peptide-based, further stability can be achieved by cyclizing the peptide, increasing its rigidity. The mimetic or mimetics found by this approach can then be screened to see whether they have the target property, or to what extent they exhibit it. Further optimization or modification can then be carried out to arrive at one or more final mimetics for *in vivo* or clinical testing.

#### Methods of Use: Nucleic Acid Diagnosis and Diagnostic Kits

In order to detect the presence of an *SCN5A* allele predisposing an individual to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation, a biological sample such as blood is prepared and analyzed for the presence or absence of susceptibility alleles of *SCN5A*. In order to detect the presence of predisposition to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation or as a prognostic indicator, a biological sample is prepared and analyzed for the presence or absence of mutant alleles of *SCN5A*. Results of these tests and interpretive information are returned to the health care provider for communication to the tested individual. Such diagnoses may be performed by diagnostic laboratories, or, alternatively, diagnostic kits are manufactured and sold to health care providers or to private individuals for self-diagnosis.

Initially, the screening method involves amplification of the relevant *SCN5A* sequences. In another preferred embodiment of the invention, the screening method involves a non-PCR based strategy. Such screening methods include two-step label amplification methodologies that are well known in the art. Both PCR and non-PCR based screening strategies can detect target sequences with a high level of sensitivity.

The most popular method used today is target amplification. Here, the target nucleic acid sequence is amplified with polymerases. One particularly preferred method using polymerase-driven amplification is the polymerase chain reaction (PCR). The polymerase chain reaction and other polymerase-driven amplification assays can achieve over a million-fold increase in copy

WO 02/08381

PCT/US01/22639

38

number through the use of polymerase-driven amplification cycles. Once amplified, the resulting nucleic acid can be sequenced or used as a substrate for DNA probes.

When the probes are used to detect the presence of the target sequences the biological sample to be analyzed, such as blood or serum, may be treated, if desired, to extract the nucleic acids. The sample nucleic acid may be prepared in various ways to facilitate detection of the target sequence, e.g. denaturation, restriction digestion, electrophoresis or dot blotting. The targeted region of the analyte nucleic acid usually must be at least partially single-stranded to form hybrids with the targeting sequence of the probe. If the sequence is naturally single-stranded, denaturation will not be required. However, if the sequence is double-stranded, the sequence will probably need to be denatured. Denaturation can be carried out by various techniques known in the art.

Analyte nucleic acid and probe are incubated under conditions which promote stable hybrid formation of the target sequence in the probe with the putative targeted sequence in the analyte. The region of the probes which is used to bind to the analyte can be made completely complementary to the targeted region of *SCN5A*. Therefore, high stringency conditions are desirable in order to prevent false positives. However, conditions of high stringency are used only if the probes are complementary to regions of the chromosome which are unique in the genome. The stringency of hybridization is determined by a number of factors during hybridization and during the washing procedure, including temperature, ionic strength, base composition, probe length, and concentration of formamide. These factors are outlined in, for example, Maniatis et al., 1982 and Sambrook et al., 1989. Under certain circumstances, the formation of higher order hybrids, such as triplexes, quadruplexes, etc., may be desired to provide the means of detecting target sequences.

Detection, if any, of the resulting hybrid is usually accomplished by the use of labeled probes. Alternatively, the probe may be unlabeled, but may be detectable by specific binding with a ligand which is labeled, either directly or indirectly. Suitable labels, and methods for labeling probes and ligands are known in the art, and include, for example, radioactive labels which may be incorporated by known methods (e.g., nick translation, random priming or kinasing), biotin, fluorescent groups, chemiluminescent groups (e.g., dioxetanes, particularly triggered dioxetanes), enzymes, antibodies, gold nanoparticles and the like. Variations of this basic scheme are known in the art, and include those variations that facilitate separation of the

WO 02/08381

PCT/US01/22639

39

hybrids to be detected from extraneous materials and/or that amplify the signal from the labeled moiety. A number of these variations are reviewed in, e.g., Matthews and Kricka, 1988; Landegren et al., 1988; Mifflin, 1989; U.S. Patent 4,868,105; and in EPO Publication No. 225,807.

5 As noted above, non-PCR based screening assays are also contemplated in this invention. This procedure hybridizes a nucleic acid probe (or an analog such as a methyl phosphonate backbone replacing the normal phosphodiester), to the low level DNA target. This probe may have an enzyme covalently linked to the probe, such that the covalent linkage does not interfere with the specificity of the hybridization. This enzyme-probe-conjugate-target nucleic acid  
10 complex can then be isolated away from the free probe enzyme conjugate and a substrate is added for enzyme detection. Enzymatic activity is observed as a change in color development or luminescent output resulting in a  $10^3$ - $10^6$  increase in sensitivity. For an example relating to the preparation of oligodeoxynucleotide-alkaline phosphatase conjugates and their use as hybridization probes, see Jablonski et al. (1986).

15 Two-step label amplification methodologies are known in the art. These assays work on the principle that a small ligand (such as digoxigenin, biotin, or the like) is attached to a nucleic acid probe capable of specifically binding *SCN5A*. Allele specific probes are also contemplated within the scope of this example and exemplary allele specific probes include probes encompassing the predisposing mutations of this patent application.

20 In one example, the small ligand attached to the nucleic acid probe is specifically recognized by an antibody-enzyme conjugate. In one embodiment of this example, digoxigenin is attached to the nucleic acid probe. Hybridization is detected by an antibody-alkaline phosphatase conjugate which turns over a chemiluminescent substrate. For methods for labeling nucleic acid probes according to this embodiment see Martin et al., 1990. In a second example,  
25 the small ligand is recognized by a second ligand-enzyme conjugate that is capable of specifically complexing to the first ligand. A well known embodiment of this example is the biotin-avidin type of interactions. For methods for labeling nucleic acid probes and their use in biotin-avidin based assays see Rigby et al., 1977 and Nguyen et al., 1992.

30 It is also contemplated within the scope of this invention that the nucleic acid probe assays of this invention will employ a cocktail of nucleic acid probes capable of detecting *SCN5A*. Thus, in one example to detect the presence of *SCN5A* in a cell sample, more than one

WO 02/08381

PCT/US01/22639

40

probe complementary to the gene is employed and in particular, the number of different probes is alternatively two, three, or five different nucleic acid probe sequences. In another example, to detect the presence of mutations in the *SCN5A* gene sequence in a patient, more than one probe complementary to these genes is employed where the cocktail includes probes capable of binding to the allele-specific mutations identified in populations of patients with alterations in *SCN5A*. In this embodiment, any number of probes can be used, and will preferably include probes corresponding to the gene mutation identified as predisposing an individual to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation.

10 Methods of Use: Peptide Diagnosis and Diagnostic Kits

The presence of predisposition to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation can also be detected on the basis of the alteration of wild-type *SCN5A* polypeptide. Such alterations can be determined by sequence analysis in accordance with conventional techniques. More preferably, antibodies (polyclonal or monoclonal) are used to detect differences in, or the absence of *SCN5A* peptides. Techniques for raising and purifying antibodies are well known in the art, and any such techniques may be chosen to achieve the preparations claimed in this invention. In a preferred embodiment of the invention, antibodies will immunoprecipitate *SCN5A* proteins from solution as well as react with these proteins on Western or immunoblots of polyacrylamide gels. In another preferred embodiment, antibodies will detect *SCN5A* proteins in paraffin or frozen tissue sections, using immunocytochemical techniques.

Preferred embodiments relating to methods for detecting *SCN5A* or its mutations include enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), radioimmunoassays (RIA), immunoradiometric assays (IRMA) and immunoenzymatic assays (IEMA), including sandwich assays using monoclonal and/or polyclonal antibodies. Exemplary sandwich assays are described by David et al., in U.S. Patent Nos. 4,376,110 and 4,486,530, hereby incorporated by reference.

20 Methods of Use: Rational Drug Design

The goal of rational drug design is to produce structural analogs of biologically active polypeptides of interest or of small molecules with which they interact (e.g., agonists, antagonists, inhibitors) in order to fashion drugs which are, for example, more active or stable forms of the polypeptide, or which, e.g., enhance or interfere with the function of a polypeptide

WO 02/08381

PCT/US01/22639

41

*in vivo*. See, e.g., Hodgson, 1991. In one approach, one first determines the three-dimensional structure of a protein of interest (e.g., SCN5A polypeptide) by x-ray crystallography, by computer modeling or most typically, by a combination of approaches. Less often, useful information regarding the structure of a polypeptide may be gained by modeling based on the structure of homologous proteins. An example of rational drug design is the development of HIV protease inhibitors (Brickson *et al.*, 1990). In addition, peptides (e.g., SCN5A polypeptide) are analyzed by an alanine scan (Wells, 1991). In this technique, an amino acid residue is replaced by Ala, and its effect on the peptide's activity is determined. Each of the amino acid residues of the peptide is analyzed in this manner to determine the important regions of the peptide.

It is also possible to isolate a target-specific antibody, selected by a functional assay, and then to solve its crystal structure. In principle, this approach yields a pharmacore upon which subsequent drug design can be based. It is possible to bypass protein crystallography altogether by generating anti-idiotypic antibodies (anti-ids) to a functional, pharmacologically active antibody. As a mirror image of a mirror image, the binding site of the anti-ids would be expected to be an analog of the original receptor. The anti-id could then be used to identify and isolate peptides from banks of chemically or biologically produced banks of peptides. Selected peptides would then act as the pharmacore.

Thus, one may design drugs which have, e.g., improved SCN5A polypeptide activity or stability or which act as inhibitors, agonists, antagonists, etc. of SCN5A polypeptide activity. By virtue of the availability of cloned *SCN5A* sequences, sufficient amounts of the SCN5A polypeptide may be made available to perform such analytical studies as x-ray crystallography. In addition, the knowledge of the SCN5A protein sequences provided herein will guide those employing computer modeling techniques in place of, or in addition to x-ray crystallography.

#### Methods of Use: Gene Therapy

According to the present invention, a method is also provided of supplying wild-type *SCN5A* function to a cell which carries a mutant *SCN5A* allele. Supplying such a function should allow normal functioning of the recipient cells. The wild-type gene or a part of the gene may be introduced into the cell in a vector such that the gene remains extrachromosomal. In such a situation, the gene will be expressed by the cell from the extrachromosomal location. More preferred is the situation where the wild-type gene or a part thereof is introduced into the mutant

WO 02/08381

PCT/US01/22639

42

cell in such a way that it recombines with the endogenous mutant gene present in the cell. Such recombination requires a double recombination event which results in the correction of the gene mutation. Vectors for introduction of genes both for recombination and for extrachromosomal maintenance are known in the art, and any suitable vector may be used. Methods for introducing DNA into cells such as electroporation, calcium phosphate co-precipitation and viral transduction are known in the art, and the choice of method is within the competence of the practitioner.

As generally discussed above, the *SCN5A* gene or fragment, where applicable, may be employed in gene therapy methods in order to increase the amount of the expression products of such gene in cells. It may also be useful to increase the level of expression of wild-type *SCN5A* even in those heart cells in which the mutant gene is expressed at a "normal" level, but the gene product is not fully functional.

Gene therapy would be carried out according to generally accepted methods, for example, as described by Friedman (1991) or Culver (1996). Cells from a patient would be first analyzed by the diagnostic methods described above, to ascertain the production of *SCN5A* polypeptide in the cells. A virus or plasmid vector (see further details below), containing a copy of the *SCN5A* gene linked to expression control elements and capable of replicating inside the cells, is prepared. The vector may be capable of replicating inside the cells. Alternatively, the vector may be replication deficient and is replicated in helper cells for use in gene therapy. Suitable vectors are known, such as disclosed in U.S. Patent 5,252,479 and PCT published application WO 93/07282 and U.S. Patent Nos. 5,691,198; 5,747,469; 5,436,146 and 5,753,500. The vector is then injected into the patient. If the transfected gene is not permanently incorporated into the genome of each of the targeted cells, the treatment may have to be repeated periodically.

Gene transfer systems known in the art may be useful in the practice of the gene therapy methods of the present invention. These include viral and nonviral transfer methods. A number of viruses have been used as gene transfer vectors or as the basis for repairing gene transfer vectors, including papovaviruses (e.g., SV40, Madzak et al., 1992), adenovirus (Berkner, 1992; Berkner et al., 1988; Gorziglia and Kapikian, 1992; Quantin et al., 1992; Rosenfeld et al., 1992; Wilkinson and Akrigg, 1992; Stratford-Perricaudet et al., 1990; Schneider et al., 1998), vaccinia virus (Moss, 1992; Moss, 1996), adeno-associated virus (Muzyczka, 1992; Ohi et al., 1990; Russell and Hirata, 1998), herpesviruses including HSV and EBV (Margolske, 1992; Johnson et al., 1992; Fink et al., 1992; Breakefield and Geller, 1987; Freese et al., 1990; Fink et al., 1996),

WO 02/08381

PCT/US01/22639

43

lentiviruses (Naldini et al., 1996), Sindbis and Semliki Forest virus (Berghlund et al., 1993), and retroviruses of avian (Bandyopadhyay and Temin, 1984; Petropoulos et al., 1992), murine (Miller, 1992; Miller et al., 1985; Sorge et al., 1984; Mann and Baltimore, 1985; Miller et al., 1988), and human origin (Shimada et al., 1991; Helseth et al., 1990; Page et al., 1990; Buchschacher and Panganiban, 1992). Most human gene therapy protocols have been based on disabled murine retroviruses, although adenovirus and adeno-associated virus are also being used.

Nonviral gene transfer methods known in the art include chemical techniques such as calcium phosphate coprecipitation (Graham and van der Eb, 1973; Pellicer et al., 1980); mechanical techniques, for example microinjection (Anderson et al., 1980; Gordon et al., 1980; Brinster et al., 1981; Costantini and Lacy, 1981); membrane fusion-mediated transfer via liposomes (Felgner et al., 1987; Wang and Huang, 1989; Kaneda et al., 1989; Stewart et al., 1992; Nabel et al., 1990; Lim et al., 1991); and direct DNA uptake and receptor-mediated DNA transfer (Wolff et al., 1990; Wu et al., 1991; Zenke et al., 1990; Wu et al., 1989; Wolff et al., 1991; Wagner et al., 1990; Wagner et al., 1991; Cotten et al., 1990; Curiel et al., 1992; Curiel et al., 1991). Viral-mediated gene transfer can be combined with direct *in vivo* gene transfer using liposome delivery, allowing one to direct the viral vectors to the tumor cells and not into the surrounding nondividing cells. Alternatively, the retroviral vector producer cell line can be injected into tumors (Culver et al., 1992). Injection of producer cells would then provide a continuous source of vector particles. This technique has been approved for use in humans with inoperable brain tumors.

In an approach which combines biological and physical gene transfer methods, plasmid DNA of any size is combined with a polylysine-conjugated antibody specific to the adenovirus hexon protein, and the resulting complex is bound to an adenovirus vector. The trimolecular complex is then used to infect cells. The adenovirus vector permits efficient binding, internalization, and degradation of the endosome before the coupled DNA is damaged. For other techniques for the delivery of adenovirus based vectors see Schneider et al. (1998) and U.S. Patent Nos. 5,691,198; 5,747,469; 5,436,146 and 5,753,500.

Liposome/DNA complexes have been shown to be capable of mediating direct *in vivo* gene transfer. While in standard liposome preparations the gene transfer process is nonspecific,

WO 02/08381

PCT/US01/22639

44

localized *in vivo* uptake and expression have been reported in tumor deposits, for example, following direct *in situ* administration (Nabel, 1992).

Expression vectors in the context of gene therapy are meant to include those constructs containing sequences sufficient to express a polynucleotide that has been cloned therein. In viral expression vectors, the construct contains viral sequences sufficient to support packaging of the construct. If the polynucleotide encodes *SCN5A*, expression will produce SCN5A. If the polynucleotide encodes an antisense polynucleotide or a ribozyme, expression will produce the antisense polynucleotide or ribozyme. Thus in this context, expression does not require that a protein product be synthesized. In addition to the polynucleotide cloned into the expression vector, the vector also contains a promoter functional in eukaryotic cells. The cloned polynucleotide sequence is under control of this promoter. Suitable eukaryotic promoters include those described above. The expression vector may also include sequences, such as selectable markers and other sequences described herein.

Gene transfer techniques which target DNA directly to heart tissue is preferred. Receptor-mediated gene transfer, for example, is accomplished by the conjugation of DNA (usually in the form of covalently closed supercoiled plasmid) to a protein ligand via polylysine. Ligands are chosen on the basis of the presence of the corresponding ligand receptors on the cell surface of the target cell/tissue type. These ligand-DNA conjugates can be injected directly into the blood if desired and are directed to the target tissue where receptor binding and internalization of the DNA-protein complex occurs. To overcome the problem of intracellular destruction of DNA, coinfection with adenovirus can be included to disrupt endosome function.

The therapy is as follows: patients who carry an *SCN5A* susceptibility allele are treated with a gene delivery vehicle such that some or all of their heart precursor cells receive at least one additional copy of a functional normal *SCN5A* allele. In this step, the treated individuals have reduced risk of drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation to the extent that the effect of the susceptible allele has been countered by the presence of the normal allele.

#### Methods of Use: Peptide Therapy

Peptides which have SCN5A activity can be supplied to cells which carry a mutant or missing SCN5A allele. Protein can be produced by expression of the cDNA sequence in bacteria, for example, using known expression vectors. Alternatively, SCN5A polypeptide can

WO 02/08381

PCT/US01/22639

45

be extracted from SCN5A-producing mammalian cells. In addition, the techniques of synthetic chemistry can be employed to synthesize SCN5A protein. Any of such techniques can provide the preparation of the present invention which comprises the SCN5A protein. The preparation is substantially free of other human proteins. This is most readily accomplished by synthesis in a microorganism or *in vitro*.

Active SCN5A molecules can be introduced into cells by microinjection or by use of liposomes, for example. Alternatively, some active molecules may be taken up by cells, actively or by diffusion. Supply of molecules with SCN5A activity should lead to partial reversal of drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation. Other molecules with SCN5A activity (for example, peptides, drugs or organic compounds) may also be used to effect such a reversal. Modified polypeptides having substantially similar function are also used for peptide therapy.

#### Methods of Use: Transformed Hosts

Animals for testing therapeutic agents can be selected after mutagenesis of whole animals or after treatment of germline cells or zygotes. Such treatments include insertion of mutant *SCN5A* alleles, usually from a second animal species, as well as insertion of disrupted homologous genes. Alternatively, the endogenous *SCN5A* gene of the animals may be disrupted by insertion or deletion mutation or other genetic alterations using conventional techniques (Capecci, 1989; Valancius and Smithies, 1991; Hasty et al., 1991; Shinkai et al., 1992; Mombaerts et al., 1992; Philpott et al., 1992; Snouwaert et al., 1992; Donchower et al., 1992). After test substances have been administered to the animals, the predisposition to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation must be assessed. If the test substance prevents or suppresses the appearance of drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation, then the test substance is a candidate therapeutic agent for prevention of drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation. These animal models provide an extremely important testing vehicle for potential therapeutic products.

The identification of the association between the *SCN5A* gene mutation and drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation permits the early presymptomatic screening of individuals to identify those at risk for developing drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation. To identify such individuals, the *SCN5A* alleles are screened for

WO 02/08381

PCT/US01/22639

46

mutations either directly or after cloning the alleles. The alleles are tested for the presence of nucleic acid sequence differences from the normal allele using any suitable technique, including but not limited to, one of the following methods: fluorescent *in situ* hybridization (FISH), direct DNA sequencing, PFGE analysis, Southern blot analysis, single stranded conformation analysis (SSCP), linkage analysis, RNase protection assay, allele specific oligonucleotide (ASO), dot blot analysis and PCR-SSCP analysis. Also useful is the recently developed technique of DNA microchip technology. For example, either (1) the nucleotide sequence of both the cloned alleles and normal *SCN5A* gene or appropriate fragment (coding sequence or genomic sequence) are determined and then compared, or (2) the RNA transcripts of the *SCN5A* gene or gene fragment are hybridized to single stranded whole genomic DNA from an individual to be tested, and the resulting heteroduplex is treated with Ribonuclease A (RNase A) and run on a denaturing gel to detect the location of any mismatches. Two of these methods can be carried out according to the following procedures.

The alleles of the *SCN5A* gene in an individual to be tested are cloned using conventional techniques. For example, a blood sample is obtained from the individual. The genomic DNA isolated from the cells in this sample is partially digested to an average fragment size of approximately 20 kb. Fragments in the range from 18-21 kb are isolated. The resulting fragments are ligated into an appropriate vector. The sequences of the clones are then determined and compared to the normal *SCN5A* gene.

Alternatively, polymerase chain reactions (PCRs) are performed with primer pairs for the 5' region or the exons of the *SCN5A* gene. PCRs can also be performed with primer pairs based on any sequence of the normal *SCN5A* gene. For example, primer pairs for one of the introns can be prepared and utilized. Finally, RT-PCR can also be performed on the mRNA. The amplified products are then analyzed by single stranded conformation polymorphisms (SSCP) using conventional techniques to identify any differences and these are then sequenced and compared to the normal gene sequence.

Individuals can be quickly screened for common *SCN5A* gene variants by amplifying the individual's DNA using suitable primer pairs and analyzing the amplified product, e.g., by dot-blot hybridization using allele-specific oligonucleotide probes.

The second method employs RNase A to assist in the detection of differences between the normal *SCN5A* gene and defective genes. This comparison is performed in steps using small

WO 02/08381

PCT/US01/22639

47

(~500 bp) restriction fragments of the *SCN5A* gene as the probe. First, the *SCN5A* gene is digested with a restriction enzyme(s) that cuts the gene sequence into fragments of approximately 500 bp. These fragments are separated on an electrophoresis gel, purified from the gel and cloned individually, in both orientations, into an SP6 vector (e.g., pSP64 or pSP65). The SP6-based plasmids containing inserts of the *SCN5A* gene fragments are transcribed *in vitro* using the SP6 transcription system, well known in the art, in the presence of [ $\alpha$ - $^{32}$ P]GTP, generating radiolabeled RNA transcripts of both strands of the gene.

Individually, these RNA transcripts are used to form heteroduplexes with the allelic DNA using conventional techniques. Mismatches that occur in the RNA:DNA heteroduplex, owing to sequence differences between the *SCN5A* fragment and the *SCN5A* allele subclone from the individual, result in cleavage in the RNA strand when treated with RNase A. Such mismatches can be the result of point mutations or small deletions in the individual's allele. Cleavage of the RNA strand yields two or more small RNA fragments, which run faster on the denaturing gel than the RNA probe itself.

Genetic testing will enable practitioners to identify individuals at risk for drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation at, or even before, birth. Presymptomatic diagnosis of drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation will enable prevention of this disorder. Genetic testing and improved mechanistic understanding of drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation provide the opportunity for prevention of life-threatening arrhythmias through rational therapies. It is possible, for example, that sodium channel blocking agents may be an effective treatment for patients with mutations that alter the function of *SCN5A*. Finally, these studies may provide insight into mechanisms underlying common arrhythmias, as these arrhythmias are often associated with abnormal cardiac repolarization and may result from a combination of inherited and acquired factors.

#### Pharmaceutical Compositions and Routes of Administration

The *SCN5A* polypeptides, antibodies, peptides and nucleic acids of the present invention can be formulated in pharmaceutical compositions, which are prepared according to conventional pharmaceutical compounding techniques. See, for example, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA). The composition may contain the active agent or pharmaceutically acceptable salts of the active agent. These compositions may

WO 02/08381

PCT/US01/22639

48

comprise, in addition to one of the active substances, a pharmaceutically acceptable excipient, carrier, buffer, stabilizer or other materials well known in the art. Such materials should be non-toxic and should not interfere with the efficacy of the active ingredient. The carrier may take a wide variety of forms depending on the form of preparation desired for administration, e.g., intravenous, oral, intrathecal, epineural or parenteral.

For oral administration, the compounds can be formulated into solid or liquid preparations such as capsules, pills, tablets, lozenges, melts, powders, suspensions or emulsions. In preparing the compositions in oral dosage form, any of the usual pharmaceutical media may be employed, such as, for example, water, glycols, oils, alcohols, flavoring agents, preservatives, coloring agents, suspending agents, and the like in the case of oral liquid preparations (such as, for example, suspensions, elixirs and solutions); or carriers such as starches, sugars, diluents, granulating agents, lubricants, binders, disintegrating agents and the like in the case of oral solid preparations (such as, for example, powders, capsules and tablets). Because of their ease in administration, tablets and capsules represent the most advantageous oral dosage unit form, in which case solid pharmaceutical carriers are obviously employed. If desired, tablets may be sugar-coated or enteric-coated by standard techniques. The active agent can be encapsulated to make it stable to passage through the gastrointestinal tract while at the same time allowing for passage across the blood brain barrier. See for example, WO 96/11698.

For parenteral administration, the compound may be dissolved in a pharmaceutical carrier and administered as either a solution or a suspension. Illustrative of suitable carriers are water, saline, dextrose solutions, fructose solutions, ethanol, or oils of animal, vegetative or synthetic origin. The carrier may also contain other ingredients, for example, preservatives, suspending agents, solubilizing agents, buffers and the like. When the compounds are being administered intrathecally, they may also be dissolved in cerebrospinal fluid.

The active agent is preferably administered in a therapeutically effective amount. The actual amount administered, and the rate and time-course of administration, will depend on the nature and severity of the condition being treated. Prescription of treatment, e.g. decisions on dosage, timing, etc., is within the responsibility of general practitioners or specialists, and typically takes account of the disorder to be treated, the condition of the individual patient, the site of delivery, the method of administration and other factors known to practitioners. Examples of techniques and protocols can be found in Remington's Pharmaceutical Sciences.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

49

Alternatively, targeting therapies may be used to deliver the active agent more specifically to certain types of cell, by the use of targeting systems such as antibodies or cell specific ligands. Targeting may be desirable for a variety of reasons, e.g. if the agent is unacceptably toxic, or if it would otherwise require too high a dosage, or if it would not otherwise be able to enter the target cells.

Instead of administering these agents directly, they could be produced in the target cell, e.g. in a viral vector such as described above or in a cell based delivery system such as described in U.S. Patent No. 5,550,050 and published PCT application Nos. WO 92/19195, WO 94/25503, WO 95/01203, WO 95/05452, WO 96/02286, WO 96/02646, WO 96/40871, WO 96/40959 and WO 97/12635, designed for implantation in a patient. The vector could be targeted to the specific cells to be treated, or it could contain regulatory elements which are more tissue specific to the target cells. The cell based delivery system is designed to be implanted in a patient's body at the desired target site and contains a coding sequence for the active agent. Alternatively, the agent could be administered in a precursor form for conversion to the active form by an activating agent produced in, or targeted to, the cells to be treated. See for example, EP 425,731A and WO 90/07936.

#### EXAMPLES

The present invention is further detailed in the following examples, which are offered by way of illustration and are not intended to limit the invention in any manner. Standard techniques well known in the art or the techniques specifically described below are utilized.

##### EXAMPLE 1

###### Identification of an *SCN5A* Mutation Associated with Drug-induced *Torsade de Pointes*

Arrhythmias frequently result from treatment with medications, most commonly antiarrhythmic drugs. To determine the genetic basis for these arrhythmias, individuals with drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation were screened for mutations in known arrhythmia genes. One of the genes which was screened is *SCN5A* the sequence of which is given by SEQ ID NO:1. The encoded *SCN5A* protein is shown as SEQ ID NO:2. This sequence is also available from GenBank as Accession No. NM000335. An *SCN5A* variant, shown as SEQ ID NO:3 was found in four African-American individuals, three of whom

WO 02/08381

PCT/US01/22639

50

experienced arrhythmia after amiodarone treatment and one after infusion of brevipal. This variant was also found in two additional African-American individuals. All six individuals had prolongation of their QT interval on electrocardiograms which was exacerbated in the four drug-induced arrhythmia cases.

5 The mutation which is seen in these individuals is the change at base 3308 of the *SCN5A* coding sequence wherein the wild-type C is an A in the mutant version. This results in the encoded protein having a tyrosine at amino acid residue 1103 rather than the serine found in the wild-type at this location. This S1103Y variant was present in 11% of the tested African-American individuals, but was not seen in other ethnic groups.

10 The S1103Y variant was detected on a 0.5X MDE (Mutation Detection Enhancement; FMC BioProducts) gel run overnight at 500V at room temperature.

#### EXAMPLE 2

##### 15 Screening Assay for Drug Candidates Useful for Treating or Preventing Drug-induced *Torsade de Pointes* or Ventricular Fibrillation

Persons with *SCN5A* encoding a protein of SEQ ID NO:4 are susceptible to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation. Drugs may prevent these effects by means, e.g., binding to the mutated *SCN5A* in a manner which prevents the drug-induced effects. Assays for screening for such drugs, irrelevant of the mechanism of action of such drugs in preventing the drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation, can be performed.

##### 20 A. *In Vitro* Assay

The assay comprises placing a first set of cells expressing the mutant *SCN5A* into a bathing solution, inducing a current across the *SCN5A* sodium channel and measuring a first induced current. A second set of cells which expresses wild-type *SCN5A* is placed into a separate bathing solution, a current is induced and a second induced current is measured. A drug is added to the first set of cells in solution, a current is induced, and a third induced current is measured. The order of measuring the second current relative to measuring the first and third currents is irrelevant. If the drug results in the third induced current being more similar to the second induced current than is the first induced current, then the drug is a drug candidate for treating persons with the mutated *SCN5A* to treat or prevent the occurrence of drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation. Preferably the cells being used which express the

WO 02/08381

PCT/US01/22639

51

mutant *SCN5A* do not also express wild-type *SCN5A*. Such cells are prepared by making transgenic cells or by injecting cells such as frog oocytes with RNA to express the mutant *SCN5A*. The term "cells" in this disclosure includes tissue samples as well as single cells.

B. *In Vivo* Assay

- 5 An assay similar to the in vitro method is performed on transgenic animals wherein the animals express either wild-type *SCN5A* or the mutant *SCN5A*. Currents are induced and measurements of the induced currents are made. The transgenic animals expressing mutant *SCN5A* have measurements made without drug treatment and with drug treatment and the measurements are compared to the induced current in animals expressing the wild-type *SCN5A*.
- 10 If the induced current in the drug-treated transgenic animal is more similar to the induced current in the wild-type animal than is the induced current in the nondrug-treated mutant animal as compared to the induced current in the wild-type animal, then the drug is a drug candidate for treating persons with the mutated *SCN5A*.

15

EXAMPLE 3

Assays to Determine Whether a Drug Can Induce

*Torsade de Pointes* in a Person with an *SCN5A* Mutation

- Certain drugs are known to cause *torsade de pointes* and ventricular fibrillation in certain individuals. As demonstrated herein, persons with the *SCN5A* S1103Y mutation are predisposed to such drug-induced effects with certain drugs. Assays to determine whether other drugs may also cause *torsade de pointes* and ventricular fibrillation in persons with this mutation can be performed.
- 20

A. *In Vitro* Assay

- One assay comprises placing cells expressing the mutant *SCN5A* into a bathing solution, inducing a current across the *SCN5A* Na<sup>+</sup> channel and measuring the induced current, then adding the drug to be tested to the bathing solution, inducing a current and measuring this second induced current. If the drug has no effect upon the induced current then it will not induce *torsade de pointes* and ventricular fibrillation in persons with this mutation as a result of the mutation. If the drug does affect the induced current then it may induce *torsade de pointes* and ventricular fibrillation in persons with the mutation.
- 25
- 30

WO 02/08381

PCT/US01/22639

52

B. *In Vivo* Assay

An *in vivo* assay to test whether a drug may cause drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation in a person with a specific mutation in *SCN5A* is to prepare a transgenic animal with mutant *SCN5A* such that the mutant *SCN5A* is expressed, induce a current across the *SCN5A* Na<sup>+</sup> channel of cells expressing the mutant *SCN5A*, administer the drug to be tested to the transgenic animal, induce a current and compare this second current with the current induced in the absence of the drug. If the drug has no effect on the induced current it will not cause *torsade de pointes* or ventricular fibrillation in a person with the *SCN5A* mutation as a result of the mutation.

10 C. *In Vivo* Assay

A second *in vivo* assay is to prepare a transgenic animal which expresses a mutant *SCN5A* gene and then administer the drug to be tested to the animal. The animal is then observed to determine whether *torsade de pointes* or ventricular fibrillation occurs. If no such adverse events occur then the drug will not induce them in persons with the mutation. If such events do occur in the transgenic animals but do not occur in animals expressing wild-type *SCN5A* when they are administered the drug, then the drugs can induce *torsade de pointes* and ventricular fibrillation in persons with the *SCN5A* mutation as a result of the mutation.

EXAMPLE 420 Generation of Polyclonal Antibody against SCN5A

Segments of *SCN5A* coding sequence are expressed as fusion protein in *E. coli*. The overexpressed protein is purified by gel elution and used to immunize rabbits and mice using a procedure similar to the one described by Harlow and Lane (1988). This procedure has been shown to generate Abs against various other proteins (for example, see Kraemer et al., 1993).

25 Briefly, a stretch of *SCN5A* coding sequence is cloned as a fusion protein in plasmid PET5A (Novagen, Inc., Madison, WI). After induction with IPTG, the overexpression of a fusion protein with the expected molecular weight is verified by SDS/PAGE. Fusion protein is purified from the gel by electroelution. Identification of the protein as the *SCN5A* fusion product is verified by protein sequencing at the N-terminus. Next, the purified protein is used as immunogen in rabbits. Rabbits are immunized with 100 µg of the protein in complete Freund's adjuvant and boosted twice in 3 week

WO 02/08381

PCT/US01/22639

53

intervals, first with 100 µg of immunogen in incomplete Freund's adjuvant followed by 100 µg of immunogen in PBS. Antibody containing serum is collected two weeks thereafter.

This procedure is repeated to generate antibodies against the mutant forms of the *SCN5A* gene product. These antibodies, in conjunction with antibodies to wild type *SCN5A*, are used to detect the presence and the relative level of the mutant forms in various tissues and biological fluids.

#### EXAMPLE 5

##### Generation of Monoclonal Antibodies Specific for SCN5A

Monoclonal antibodies are generated according to the following protocol. Mice are immunized with immunogen comprising intact *SCN5A* or *SCN5A* peptides (wild type or mutant) conjugated to keyhole limpet hemocyanin using glutaraldehyde or EDC, as is well known.

The immunogen is mixed with an adjuvant. Each mouse receives four injections of 10 to 100 µg of immunogen and after the fourth injection blood samples are taken from the mice to determine if the serum contains antibody to the immunogen. Serum titer is determined by ELISA or RIA. Mice with sera indicating the presence of antibody to the immunogen are selected for hybridoma production.

Spleens are removed from immune mice and a single cell suspension is prepared (see Harlow and Lane, 1988). Cell fusions are performed essentially as described by Kohler and Milstein (1975). Briefly, P3.65.3 myeloma cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) are fused with immune spleen cells using polyethylene glycol as described by Harlow and Lane (1988). Cells are plated at a density of  $2 \times 10^5$  cells/well in 96 well tissue culture plates. Individual wells are examined for growth and the supernatants of wells with growth are tested for the presence of *SCN5A* specific antibodies by ELISA or RIA using wild type or mutant *SCN5A* target protein. Cells in positive wells are expanded and subcloned to establish and confirm monoclonality.

Clones with the desired specificities are expanded and grown as ascites in mice or in a hollow fiber system to produce sufficient quantities of antibody for characterization and assay development.

#### EXAMPLE 6

##### Sandwich Assay for SCN5A

Monoclonal antibody is attached to a solid surface such as a plate, tube, bead or particle. Preferably, the antibody is attached to the well surface of a 96-well ELISA plate. 100 µL sample (e.g.,

WO 02/08381

PCT/US01/22639

54

serum, urine, tissue cytosol) containing the SCN5A peptide/protein (wild-type or mutants) is added to the solid phase antibody. The sample is incubated for 2 hrs at room temperature. Next the sample fluid is decanted, and the solid phase is washed with buffer to remove unbound material. 100  $\mu$ L of a second monoclonal antibody (to a different determinant on SCN5A peptide/protein) is added to the solid phase. This antibody is labeled with a detector molecule (e.g.,  $^{125}$ I, enzyme, fluorophore, or a chromophore) and the solid phase with the second antibody is incubated for two hrs at room temperature. The second antibody is decanted and the solid phase is washed with buffer to remove unbound material.

The amount of bound label, which is proportional to the amount of SCN5A peptide/protein present in the sample, is quantified. Separate assays are performed using monoclonal antibodies which are specific for the wild-type SCN5A as well as monoclonal antibodies specific for each of the mutations identified in SCN5A.

#### EXAMPLE 7

##### Assay to Screen Drugs Affecting the SCN5A Na<sup>+</sup> Channel

With the knowledge that SCN5A forms a cardiac sodium channel, it is now possible to devise an assay to screen for drugs which will have an effect on this channel. The gene *SCN5A* is transfected into oocytes or mammalian cells and expressed as described above. The transfection is performed using wild-type or specifically mutated *SCN5A*. When the gene used for transfection contains a mutation which causes predisposition to drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation a change in the induced current is seen as compared to transfection with the wild-type gene. A drug candidate is added to the bathing solution of the transfected cells to test the effects of the drug candidates upon the induced current. A drug candidate, which alters the induced current such that it is closer to the current seen with cells transfected with wild-type *SCN5A*, is useful for treating drug-induced *torsade de pointes* and ventricular fibrillation.

While the invention has been disclosed in this patent application by reference to the details of preferred embodiments of the invention, it is to be understood that the disclosure is intended in an illustrative rather than in a limiting sense, as it is contemplated that modifications will readily occur to those skilled in the art, within the spirit of the invention and the scope of the appended claims.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

55

LIST OF REFERENCES

- Altschul SF, et al. (1997). *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.
- Anand, R (1992). Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press).
- Anderson WF, et al. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5399-5403.
- 5 Antzelevitch C and Sicouri S (1994). *J. Am. Col. Card.* 23:259-277.
- Antzelevitch C, et al. (1999). *J. Electrocardiol.* 32 (Suppl. 1):158-165.
- Attali B, et al. (1993). *Nature* 365:850-852.
- Attwell D, et al. (1979). *Pflugers Arch.* 379:137-142.
- 10 Ausubel FM, et al. (1992). Current Protocols in Molecular Biology. (John Wiley & Sons, New York, NY).
- Bandyopadhyay PK and Temin HM (1984). *Mol. Cell. Biol.* 4:749-754.
- Bartel PL, et al. (1993). "Using the 2-hybrid system to detect protein-protein interactions." In Cellular Interactions in Development: A Practical Approach, Oxford University Press, pp. 153-179.
- 15 Bazzett H (1920). *Heart* 7:353-370.
- Beaucage SL and Caruthers MH (1981). *Tetra. Letts.* 22:1859-1862.
- Berghund P, et al. (1993). *Biotechnology* 11:916-920.
- Berkner KL, et al. (1988). *BioTechniques* 6:616-629.
- Berkner KL (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:39-66.
- 20 Borman S (1996). *Chemical & Engineering News*, December 9 issue, pp. 42-43.
- Breakefield XO and Geller AI (1987). *Mol. Neurobiol.* 1:337-371.
- Brinster RL, et al. (1981). *Cell* 27:223-231.
- Bruggemann A, et al. (1993). *Nature* 365:445-448.
- Buchsacher GL and Pangniban AT (1992). *J. Virol.* 66:2731-2739.
- 25 Busch AE, et al. (1992). *Science* 255:1705-1707.
- Capecchi MR (1989). *Science* 244:1288.
- Cardiac Arrhythmia Suppression Trial II Investigators (1992). *N. Engl. J. Med.* 327:227-233.
- Cariello NF (1988). *Am. J. Human Genetics* 42:726-734.
- Chee M, et al. (1996). *Science* 274:610-614.
- 30 Chevray PM and Nathans DN (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5789-5793.
- Compton J (1991). *Nature* 350:91-92.
- Conner BJ, et al. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:278-282.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

56

- Costantini F and Lacy E (1981). *Nature* **294**:92-94.
- Cotten M, et al. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:4033-4037.
- Cotton RG, et al. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:4397-4401.
- Coudere JP, et al. (1999). *Pacing Clin. Electrophysiol.* **22**:1581-1592.
- 5 Culver KW, et al. (1992). *Science* **256**:1550-1552.
- Culver K (1996). *Gene Therapy: A Primer for Physicians*, 2nd Ed., Mary Ann Liebert.
- Curiel DT, et al. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:8850-8854.
- Curiel DT, et al. (1992). *Hum. Gene Ther.* **3**:147-154.
- Curran ME, et al. (1995). *Cell* **80**:795-804.
- 10 DeRisi J, et al. (1996). *Nat. Genet.* **14**:457-460.
- Deschenes I, et al. (2000). *Cardiovasc. Res.* **46**:55-65.
- Deutscher M (1990). *Meth. Enzymology* **182**:83-89 (Academic Press, San Diego, Cal.).
- Donchower LA, et al. (1992). *Nature* **356**:215.
- Duggal P et al. (1998). *Circulation* **97**:142-146.
- 15 Editorial (1996). *Nature Genetics* **14**:367-370.
- Elghanian R, et al. (1997). *Science* **277**:1078-1081.
- Enhancers and Eukaryotic Gene Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1983).
- Erickson J, et al. (1990). *Science* **249**:527-533.
- 20 Fahy E, et al. (1991). *PCR Methods Appl.* **1**:25-33.
- Felgner PL, et al. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:7413-7417.
- Fields S and Song O-K (1989). *Nature* **340**:245-246.
- Fiers W, et al. (1978). *Nature* **273**:113-120.
- Fink DJ, et al. (1992). *Hum. Gene Ther.* **3**:11-19.
- 25 Fink DJ, et al. (1996). *Ann. Rev. Neurosci.* **19**:265-287.
- Finkelstein J, et al. (1990). *Genomics* **7**:167-172.
- Fodor SPA (1997). *Science* **277**:393-395.
- Freese A, et al. (1990). *Biochem. Pharmacol.* **40**:2189-2199.
- Friedman T (1991). In Therapy for Genetic Diseases, T. Friedman, ed., Oxford University Press, pp. 105-121.
- 30 Gellens M, et al. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:554-558.
- George AL, et al. (1995). *Cytogenet. Cell. Genet.* **68**:67-70.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

57

- Glover D (1985). DNA Cloning, I and II (Oxford Press).
- Goding (1986). Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed. (Academic Press, N.Y.).
- Godowski PJ, et al. (1988). *Science* **241**:812-816.
- Goldstein SAN and Miller C (1991). *Neuron* **7**:403-408.
- 5 Gordon JW, et al. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:7380-7384.
- Gorziglia M and Kapikian AZ (1992). *J. Virol.* **66**:4407-4412.
- Graham FL and van der Eb AJ (1973). *Virology* **52**:456-467.
- Grompe M (1993). *Nature Genetics* **5**:111-117.
- Grompe M, et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:5855-5892.
- 10 Guthrie G and Fink GR (1991). Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press).
- Hacia JG, et al. (1996). *Nature Genetics* **14**:441-447.
- Harlow E and Lane D (1988). Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- Hasty PK, et al. (1991). *Nature* **350**:243.
- 15 Hausdorff SF, et al. (1991). *Biochem.* **30**:3341-3346.
- Helseth E, et al. (1990). *J. Virol.* **64**:2416-2420.
- Hodgson J (1991). *Bio/Technology* **9**:19-21.
- Huse WD, et al. (1989). *Science* **246**:1275-1281.
- Innis MA, et al. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, San Diego, CA).
- 20 Jablonski E, et al. (1986). *Nucl. Acids Res.* **14**:6115-6128.
- Jakoby WB and Pastan IH (eds.) (1979). Cell Culture. Methods in Enzymology Vol. 58 (Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich (NY)).
- January CT and Riddle JM (1989). *Circ. Res.* **64**:977-990.
- 25 Jervell A and Lange-Nielsen F (1957). *Am. Heart J.* **54**:59-68.
- Jiang C, et al. (1994). *Nat. Genet.* **8**:141-147.
- Johnson PA, et al. (1992). *J. Virol.* **66**:2952-2965.
- Johnson, et al. (1993). "Peptide Turn Mimetics" in Biotechnology and Pharmacy, Pezzuto et al., eds., Chapman and Hall, New York.
- 30 Kambouris NG, et al. (2000). *J. Clin. Invest.* **105**:1133-1140.
- Kaneda Y, et al. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**:12126-12129.
- Kanehisa M (1984). *Nucl. Acids Res.* **12**:203-213.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

58

- Kannel WB, et al. (1987). *Am. Heart J.* 113:799-804.
- Keating MT, et al. (1991a). *Science* 252:704-706.
- Keating MT, et al. (1991b). *Am. J. Hum. Genet.* 49:1335-1339.
- Kinszler KW, et al. (1991). *Science* 251:1366-1370.
- 5 Kohler G and Milstein C (1975). *Nature* 256:495-497.
- Kraemer FB, et al. (1993). *J. Lipid Res.* 34:663-672.
- Kubo T, et al. (1988). *FEBS Lett.* 241:119.
- Kyte J and Doolittle RF (1982). *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
- Landegren U, et al. (1988). *Science* 242:229-237.
- 10 Lee JE, et al. (1995). *Science* 268:836-844.
- Lesage F, et al. (1993). *Receptors and Channels* 1:143-152.
- Lim CS, et al. (1991). *Circulation* 83:2007-2011.
- Lipshutz RJ, et al. (1995). *BioTechniques* 19:442-447.
- Lockhart DJ, et al. (1996). *Nature Biotechnology* 14:1675-1680.
- 15 Madzak C, et al. (1992). *J. Gen. Virol.* 73:1533-1536.
- Maniatis T, et al. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- Mann R and Baltimore D (1985). *J. Virol.* 54:401-407.
- Margolskee RF (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:67-95.
- 20 Martin R, et al. (1990). *BioTechniques* 9:762-768.
- Matteucci MD and Caruthers MH (1981). *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185.
- Matthews JA and Kricka LJ (1988). *Anal. Biochem.* 169:1.
- Merrifield B (1963). *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2156.
- Metzger D, et al. (1988). *Nature* 334:31-36.
- 25 Mifflin TE (1989). *Clinical Chem.* 35:1819-1825.
- Miller AD (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:1-24.
- Miller AD, et al. (1985). *Mol. Cell. Biol.* 5:431-437.
- Miller AD, et al. (1988). *J. Virol.* 62:4337-4345.
- Modrich P (1991). *Ann. Rev. Genet.* 25:229-253.
- 30 Mombaerts P, et al. (1992). *Cell* 68:869.
- Moss AJ and McDonald J (1971). *N. Engl. J. Med.* 285:903-904.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

59

- Moss AJ, et al. (1991). *Circulation* 84:1136-1144.
- Moss B (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:25-38.
- Moss B (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11341-11348.
- Muzyczka N (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:97-129.
- 5 Nabel EG, et al. (1990). *Science* 249:1285-1288.
- Nabel (1992). *Hum. Gene Ther.* 3:399-410.
- Naldini L, et al. (1996). *Science* 272:263-267.
- Newton CR, et al. (1989). *Nucl. Acids Res.* 17:2503-2516.
- Neyroud N, et al. (1997). *Nat. Genet.* 15:186-189.
- 10 Nguyen Q, et al. (1992). *BioTechniques* 13:116-123.
- Novack DF, et al. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:586-590.
- Ohi S, et al. (1990). *Gene* 89:279-282.
- Orita M, et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766-2770.
- Page KA, et al. (1990). *J. Virol.* 64:5270-5276.
- 15 Pellicer A, et al. (1980). *Science* 209:1414-1422.
- Petropoulos CJ, et al. (1992). *J. Virol.* 66:3391-3397.
- Philpott KL, et al. (1992). *Science* 256:1448.
- Quantin B, et al. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2581-2584.
- Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA).
- 20 Rigby PWJ, et al. (1977). *J. Mol. Biol.* 113:237-251.
- Romano C (1965). *Lancet* 1:658-659.
- Romano C, et al. (1963). *Clin. Pediatr.* 45:656-683.
- Rook MB, et al. (1999). *Cardiovasc. Res.* 44:507-517.
- Rosenfeld MA, et al. (1992). *Cell* 68:143-155.
- 25 Ruano G and Kidd KK (1989). *Nucl. Acids Res.* 17:8392.
- Russell MW, et al. (1995). *Am. J. Hum. Genet.* 57:503-507.
- Russell D and Hirata R (1998). *Nature Genetics* 18:323-328.
- Sambrook J, et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- 30 Sanguinetti MC, et al. (1996). *Nature* 384:80-83.
- Scharf SJ, et al. (1986). *Science* 233:1076-1078.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

60

- Schneider G, et al. (1998). *Nature Genetics* 18:180-183.
- Schott J, et al. (1995). *Am. J. Hum. Genet.* 57:1114-1122.
- Schultze-Bahr E, et al. (1997). *Nat. Genet.* 17:267-268.
- Schwartz PJ, et al. (1975). *Am. Heart J.* 109:378-390.
- 5 Schwartz PJ, et al. (1994). "The long QT syndrome." In *Cardiac Electrophysiology: from cell to bedside*. D. P. Zipes and J. Jalife eds. (W.B. Sanders Company) pp.788-811.
- Scopes R (1982). *Protein Purification: Principles and Practice*, (Springer-Verlag, NY).
- Sheffield VC, et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:232-236.
- Sheffield VC, et al. (1991). *Am. J. Hum. Genet.* 49:699-706.
- 10 Shenk TE, et al. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:989-993.
- Shimada T, et al. (1991). *J. Clin. Invest.* 88:1043-1047.
- Shinkai Y, et al. (1992). *Cell* 68:855.
- Shoemaker DD, et al. (1996). *Nature Genetics* 14:450-456.
- Snouwraert JN, et al. (1992). *Science* 257:1083.
- 15 Sorge J, et al. (1984). *Mol. Cell. Biol.* 4:1730-1737.
- Spargo CA, et al. (1996). *Mol. Cell. Probes* 10:247-256.
- Splawski I, et al. (1997a). *N. Engl. J. Med.* 336:1562-1567.
- Splawski I, et al. (1997b). *Nat. Genet.* 17:338-340.
- Stewart MJ, et al. (1992). *Hum. Gene Ther.* 3:267-275.
- 20 Stratford-Perricaudet LD, et al. (1990). *Hum. Gene Ther.* 1:241-256.
- Surawicz B (1989). *J. Am. Coll. Cardiol.* 14:172-184.
- Takumi T, et al. (1988). *Science* 242:1042-1045.
- Takumi T, et al. (1991). *J. Biol. Chem.* 266:22192-22198.
- Tyson J, et al. (1997). *Hum. Mol. Genet.* 6:2179-2185.
- 25 Valancius V and Smithies O (1991). *Mol. Cell Biol.* 11:1402.
- Veldkamp MW, et al. (2000). *Circ. Res.* 12:E91-E97.
- Vetter DE, et al. (1996). *Neuron* 17:1251-1264.
- Vincent GM, et al. (1992). *N. Engl. J. Med.* 327:846-852.
- Wagner E, et al. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4255-4259.
- 30 Wagner E, et al. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3410-3414.
- Walker GT, et al., (1992). *Nucl. Acids Res.* 20:1691-1696.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

61

- Wang CY and Huang L (1989). *Biochemistry* 28:9508-9514.
- Wang DW, et al. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13200-13205.
- Wang KW and Goldstein SA (1995). *Neuron* 14:1303-1309.
- Wang KW, et al. (1996). *Neuron* 16:571-577.
- 5 Wang Q, et al. (1995). *Cell* 80:805-811.
- Wang Q, et al. (1996). *Nat. Genet.* 12:17-23.
- Ward OC (1964). *J. Ir. Med. Assoc.* 54:103-106.
- Warmke JE and Ganetzky B (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:3438-3442.
- Wartell RM, et al. (1990). *Nucl. Acids Res.* 18:2699-2705.
- 10 Wells JA (1991). *Methods Enzymol.* 202:390-411.
- Wetmur JG and Davidson N (1968). *J. Mol. Biol.* 31:349-370.
- White MB, et al. (1992). *Genomics* 12:301-306.
- White R and Lalouel JM (1988). *Annu. Rev. Genet.* 22:259-279.
- Wilkinson GW and Akrigg A (1992). *Nucleic Acids Res.* 20:2233-2239.
- 15 Willich SN, et al. (1987). *Am. J. Cardiol.* 60:801-806.
- Wolff JA, et al. (1990). *Science* 247:1465-1468.
- Wolff JA, et al. (1991). *BioTechniques* 11:474-485.
- Wu DY and Wallace RB (1989). *Genomics* 4:560-569.
- Wu CH, et al. (1989). *J. Biol. Chem.* 264:16985-16987.
- 20 Wu GY, et al. (1991). *J. Biol. Chem.* 266:14338-14342.
- Zenke M, et al. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3655-3659.
- Zipes DP (1987). *Am. J. Cardiol.* 59:26E-31E.

Patents and Patent Applications:

- 25 European Patent Application Publication No. 0332435.
- EPO Publication No. 225,807.
- Hitzeman et al., EP 73,675A.
- EP 425,731A.
- WO 84/03564.
- 30 WO 90/07936.
- WO 92/19195.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

62

- WO 93/07282.  
WO 94/25503.  
WO 95/01203.  
WO 95/05452.  
5 WO 96/02286.  
WO 96/02646.  
WO 96/11698.  
WO 96/40871.  
WO 96/40959.  
10 WO 97/02048.  
WO 97/12635.  
U.S. Patent 3,817,837.  
U.S. Patent 3,850,752.  
U.S. Patent 3,939,350.  
15 U.S. Patent 3,996,345.  
U.S. Patent 4,275,149.  
U.S. Patent 4,277,437.  
U.S. Patent 4,366,241.  
U.S. Patent 4,376,110.  
20 U.S. Patent 4,486,530.  
U.S. Patent 4,554,101.  
U.S. Patent 4,683,195.  
U.S. Patent 4,683,202.  
U.S. Patent 4,816,567.  
25 U.S. Patent 4,868,105.  
U.S. Patent 5,252,479.  
U.S. Patent 5,270,184.  
U.S. Patent 5,409,818.  
U.S. Patent 5,436,146.  
30 U.S. Patent 5,455,166.  
U.S. Patent 5,550,050.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

63

U.S. Patent 5,691,198.  
U.S. Patent 5,735,500.  
U.S. Patent 5,747,469.  
U.S. Patent 5,846,710.  
5 U.S. Patent 5,856,092.  
U.S. Patent 5,888,819.  
U.S. Patent 6,004,744.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

64

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated DNA comprising a nucleic acid encoding the polypeptide of SEQ ID NO:4.
2. A nucleic acid probe which hybridizes specifically to the DNA of claim 1 under stringent hybridization conditions wherein said stringent hybridization conditions prevent said nucleic acid probe from hybridizing to DNA of SEQ ID NO:1.
3. A method for diagnosing a polymorphism which causes predisposition to drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation comprising hybridizing a probe of claim 2 to a patient's sample of DNA or RNA under stringent conditions which allow hybridization of said probe to nucleic acid comprising said polymorphism but prevent hybridization of said probe to a nucleic acid of SEQ ID NO:1 wherein the presence of a hybridization signal indicates the presence of said polymorphism.
4. The method according to claim 3 wherein the patient's DNA or RNA has been amplified and said amplified DNA or RNA is hybridized.
5. A method according to claim 3 wherein hybridization is performed *in situ*.
6. A method for diagnosing the presence of a polymorphism in human *SCN5A* which causes predisposition to drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation wherein said method is performed by means which identify the presence of said polymorphism, wherein said polymorphism is one which results in *SCN5A* encoding the polypeptide of SEQ ID NO:4.
7. The method of claim 6 wherein said means comprises:
  - a) using a single-stranded conformation polymorphism technique to assay for said polymorphism;
  - b) sequencing human *SCN5A*;
  - c) performing an RNase assay;

WO 02/08381

PCT/US01/22639

65

- d) performing an allele specific hybridization;
  - e) performing a single base extension assay;
  - f) performing an allele specific polymerase chain reaction;
  - g) amplifying all or part of the *SCN5A* gene from a patient's sample to produce an amplified sequence and sequencing the amplified sequence;
  - h) molecularly cloning all or part of the *SCN5A* gene from a patient's sample to produce a cloned sequence and sequencing the cloned sequence;
  - i) amplification of *SCN5A* gene sequences in a patient's sample and hybridization of the amplified sequences to nucleic acid probes which comprise wild-type *SCN5A* gene sequences;
  - j) amplification of *SCN5A* gene sequences in said tissue and hybridization of the amplified sequences to nucleic acid probes which comprise mutant *SCN5A* gene sequences;
  - k) determining *in situ* hybridization of the *SCN5A* gene from a patient's sample with one or more nucleic acid probes which comprise the *SCN5A* gene sequence or a mutant *SCN5A* gene sequence;
  - l) immunoblotting; and
  - m) immunocytochemistry.
8. An isolated polypeptide of SEQ ID NO.4.
9. An antibody which binds to the polypeptide of claim 8 but not to wild-type *SCN5A* polypeptide.
10. A method for diagnosing predisposition to drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation said method consisting of an assay for the presence of mutant *SCN5A* polypeptide in a patient by reacting a patient's sample with an antibody of claim 9 wherein the presence of a positive reaction is indicative of said predisposition.
11. The method of claim 10 wherein said antibody is a monoclonal antibody.
12. The method of claim 10 wherein said assay comprises immunoblotting.

WO 02/08381

PCT/US01/22639

66

13. The method of claim 10 wherein said assay comprises an immunocytochemical technique.
14. A method for diagnosing predisposition to drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation in a person wherein said method comprises sequencing an SCN5A polypeptide from said person or sequencing SCN5A polypeptide synthesized from nucleic acid derived from said person wherein the presence a tyrosine at amino acid residue 1103 is indicative of said predisposition.
15. A cell transfected with the DNA of claim 1.
16. A vector comprising the isolated DNA of claim 1.
17. A cell transfected with the vector of claim 16.
18. A nonhuman, transgenic animal comprising the DNA of claim 1.
19. A method to screen for drugs which are useful in treating a person with a mutation in *SCN5A* wherein said mutation results in *SCN5A* encoding the polypeptide of SEQ ID NO:4, wherein said method comprises:
  - (a) placing a first set of cells expressing SCN5A with said mutation into a bathing solution;
  - (b) inducing a first induced Na<sup>+</sup> current in the cells of step (a);
  - (c) measuring said first induced Na<sup>+</sup> current;
  - (d) placing a second set of cells expressing wild-type SCN5A into a bathing solution;
  - (e) inducing a second induced Na<sup>+</sup> current in the cells of step (d);
  - (f) measuring said second induced Na<sup>+</sup> current;
  - (g) adding a drug to the bathing solution of step (a);
  - (h) inducing a third induced Na<sup>+</sup> current in the cells of step (g);
  - (i) measuring said third induced Na<sup>+</sup> current; and
  - (j) determining whether the third induced Na<sup>+</sup> current is more similar to the second induced Na<sup>+</sup> current than is the first induced Na<sup>+</sup> current, wherein drugs resulting in a third induced

WO 02/08381

PCT/US01/22639

67

Na<sup>+</sup> current which is closer to the second induced Na<sup>+</sup> current than is the first induced Na<sup>+</sup> current are useful in treating said persons.

20. The method of claim 19 wherein said first set of cells, said second set of cells or both sets of cells are obtained from a transgenic animal.
21. The method of claim 19 wherein said first set of cells, said second set of cells or both sets of cells are transfected with human *SCN5A* RNA.
22. A method to screen for drugs which are useful in treating or preventing drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation, said method comprising:
  - (a) placing cells expressing wild-type *SCN5A* into a bathing solution to measure current;
  - (b) inducing a first induced Na<sup>+</sup> current in the cells of step (a)
  - (c) measuring said first induced Na<sup>+</sup> current;
  - (d) placing cells expressing mutant *SCN5A*, wherein said mutant *SCN5A* encodes a polypeptide of SEQ ID NO:4, into a bathing solution to measure current;
  - (e) inducing a second induced Na<sup>+</sup> current in the cells of step (d);
  - (f) measuring said second induced Na<sup>+</sup> current;
  - (g) adding a drug to the bathing solution of step (d);
  - (h) inducing a third induced Na<sup>+</sup> current in the cells of step (g);
  - (i) measuring said third induced Na<sup>+</sup> current; and
  - (j) determining whether the drug resulted in said third induced Na<sup>+</sup> current being more similar to or less similar to said first induced Na<sup>+</sup> current as compared to said second induced Na<sup>+</sup> current,wherein a drug which results in said third induced Na<sup>+</sup> current being more similar to said first induced Na<sup>+</sup> current than is said second induced Na<sup>+</sup> current is useful in treating or preventing drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation.
23. The method of claim 22 wherein: i) said cells of step (a), ii) said cells of step (d) or iii) said cells of steps (a) and (d) are transfected with RNA.

24. A method to screen for drugs which are useful in treating or preventing drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation, said method comprising:
- (a) preparing a transgenic animal transfected with wild-type *SCN5A*;
  - (b) inducing a first induced  $\text{Na}^+$  current in transgenic cells of said transgenic animal;
  - (c) measuring said first induced  $\text{Na}^+$  current;
  - (d) preparing a transgenic animal transfected with mutant *SCN5A*, wherein said mutant *SCN5A* encodes a polypeptide of SEQ ID NO:4;
  - (e) inducing a second induced  $\text{Na}^+$  current in transgenic cells of said transgenic animal of step (d);
  - (f) measuring said second induced  $\text{Na}^+$  current;
  - (g) administering a drug to the transgenic animal of step (d);
  - (h) inducing a third induced  $\text{Na}^+$  current in transgenic cells of said transgenic animal of step (g);
  - (i) measuring said third induced  $\text{Na}^+$  current; and
  - (j) determining whether said third induced  $\text{Na}^+$  current is more similar to or less similar to said first induced  $\text{Na}^+$  current as compared to said second induced  $\text{Na}^+$ ,
- wherein a drug which results in said third induced  $\text{Na}^+$  current being more similar to said first induced  $\text{Na}^+$  current than is said second induced  $\text{Na}^+$  current is useful in treating or preventing drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation.
25. A method to determine whether a drug has a risk of inducing *torsade de pointes* or ventricular fibrillation in a patient wherein said patient's genome comprises a gene encoding a polypeptide of SEQ ID NO:4, comprising:
- a) placing cells expressing mutant *SCN5A*, wherein said mutant *SCN5A* encodes a polypeptide of SEQ ID NO:4, into a bathing solution to measure current;
  - b) inducing a first induced  $\text{Na}^+$  current in the cells of step (a);
  - c) measuring said first induced  $\text{Na}^+$  current;
  - d) adding said drug to the bathing solution of step (c);
  - e) inducing a second induced  $\text{Na}^+$  current in the cells of step (d);
  - f) measuring said second induced  $\text{Na}^+$  current; and

WO 02/08381

PCT/US01/22639

69

g) determining whether the drug resulted in said second induced  $\text{Na}^+$  current being different from said first induced  $\text{Na}^+$  current, wherein if a different current is induced said drug has a risk of inducing *torsade de pointes* or ventricular fibrillation in said patient.

26. The method of claim 25 wherein said cells are obtained from a transgenic animal.
27. The method of claim 25 wherein said cells are transfected with human *SCN5A* RNA encoding a polypeptide of SEQ ID NO:4.
28. A method to screen for drugs which present a risk of inducing *torsade de pointes* or ventricular fibrillation, said method comprising:
  - a) preparing a transgenic animal transfected with mutant *SCN5A*, wherein said mutant *SCN5A* encodes a polypeptide of SEQ ID NO:4;
  - b) inducing a first induced  $\text{Na}^+$  current in transgenic cells of said transgenic animal of step (a);
  - c) measuring said first induced  $\text{Na}^+$  current;
  - d) administering a drug to said transgenic animal;
  - e) inducing a second induced  $\text{Na}^+$  current in transgenic cells of said transgenic animal of step (d);
  - f) measuring said second induced  $\text{Na}^+$  current;
  - g) determining whether said second induced  $\text{Na}^+$  current is different from said first induced  $\text{Na}^+$  current;wherein a drug which results in a different current presents a risk of inducing *torsade de pointes* or ventricular fibrillation in a person comprising a gene encoding a polypeptide of SEQ ID NO:4.
29. A method to screen for drugs which present a risk of inducing *torsade de pointes* or ventricular fibrillation, said method comprising:
  - (a) preparing a transgenic animal transfected with mutant *SCN5A*, wherein said mutant *SCN5A* encodes a polypeptide of SEQ ID NO:4;
  - (b) administering a drug to the transgenic animal of step (a); and

WO 02/08381

PCT/US01/22639

70

(c) determining whether the drug induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation in said transgenic animal.

30. A method of testing a compound to determine if it is capable of modulating an activity of a protein of SEQ ID NO:4, comprising the steps of:
- a) providing a host cell of claim 15;
  - b) determining said activity of said protein in the absence of said compound;
  - c) contacting said host cell with said compound; and
  - d) determining said activity of said protein in the presence of said compound;
- wherein a difference between the activity determined in step (b) and the activity determined in step (d) indicates modulation by said compound.
31. The method of claim 30 wherein said host cell is transfected with RNA.

**PCT/US01/22639**

1

## SEQUENCE LISTING

Splawski, Igor

<120> Common Polymorphism in SCN5A Implicated in Drug-induced Cardiac Arrhythmia

<130> 2323-154 . PCT

<160> 6

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 8491

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (151) .. (6198)

<220>

<221> Unsure

<222> (7027) . . (8467)

<223> Each n in this region is a nucleotide for which the base is unknown

<400> 1

gcccgtgagc ctgcgcccag tgcccagagc cccgcgcgga gccgagtcgc cccaagcac 60

cagccgccca ccccgggggc cggccggggg accagcagct tccccacagg caacgtgagg 120

agagcctgtg cccagaagca qgatgagaag atg qca aac ttc cta tta cct cgg 174

Met Ala Asn Phe Leu Leu Pro Arg

ggc acc agc agc ttc cgc agg ttc aca cgg gag tcc ctg gca gcc atc 222  
Gly Thr Ser Ser Phe Arg Arg Phe Thr Arg Glu Ser Leu Ala Ala Ile  
10 15 20

gag aag cgc atg gcg gag aag caa gcc cgc ggc tca acc acc ttg cag 270  
Glu Lys Arg Met Ala Glu Lys Gln Ala Arg Gly Ser Thr Thr Leu Gln  
25 30 35 40

gag agc cga gag ggg ctg ccc gag gag gag gct ccc cgg ccc cag ctg 318  
Glu Ser Arg Glu Gly Leu Pro Glu Glu Glu Ala Pro Arg Pro Gln Leu  
45 50 55

gac ctg cag gcc tcc aaa aag ctg cca gat ctc tat ggc aat cca ccc 366  
Asp Leu Gln Ala Ser Lys Lys Leu Pro Asp Leu Tyr Gly Asn Pro Pro  
60 65 70

caa gag ctc atc gga gag ccc ctg gag gac ctg gac ccc ttc tat agc 414  
Gln Glu Leu Ile Gly Glu Pro Leu Glu Asp Leu Asp Pro Phe Tyr Ser  
75 80 85

WO 02/08381

PCT/US01/22639

2

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| acc caa aag act ttc atc gta ctg aat aaa ggc aag acc atc ttc cgg<br>Thr Gln Lys Thr Phe Ile Val Leu Asn Lys Gly Lys Thr Ile Phe Arg<br>90 95 100       | 462  |
| ttc agt gcc acc aac gcc ttg tat gtc ctc agt ccc ttc cac cca gtt<br>Phe Ser Ala Thr Asn Ala Leu Tyr Val Leu Ser Pro Phe His Pro Val<br>105 110 115 120 | 510  |
| cgg aga gcg gct gtg aag att ctg gtt cac tog ctc ttc aac atg ctc<br>Arg Arg Ala Ala Val Lys Ile Leu Val His Ser Leu Phe Asn Met Leu<br>125 130 135     | 558  |
| atc atg tgc acc atc ctc acc aac tgc gtg ttc atg gcc cag cac gac<br>Ile Met Cys Thr Ile Leu Thr Asn Cys Val Phe Met Ala Gln His Asp<br>140 145 150     | 606  |
| cct cca ccc tgg acc aag tat gtc gag tac acc ttc acc gcc att tac<br>Pro Pro Trp Thr Lys Tyr Val Glu Tyr Thr Phe Thr Ala Ile Tyr<br>155 160 165         | 654  |
| acc ttt gag tct ctg gtc aag att ctg gct cga gct ttc tgc ctg cac<br>Thr Phe Glu Ser Leu Val Lys Ile Leu Ala Arg Ala Phe Cys Leu His<br>170 175 180     | 702  |
| gcg ttc act ttc ctt cgg gac cca tgg aac tgg ctg gac ttt agt gtg<br>Ala Phe Thr Phe Leu Arg Asp Pro Trp Asn Trp Leu Asp Phe Ser Val<br>185 190 195 200 | 750  |
| att atc atg gca tac aca act gaa ttt gtg gac ctg ggc aat gtc tca<br>Ile Ile Met Ala Tyr Thr Thr Glu Phe Val Asp Leu Gly Asn Val Ser<br>205 210 215     | 798  |
| gcc tta cgc acc ttc cga gtc ctc cgg gcc ctg aaa act ata tca gtc<br>Ala Leu Arg Thr Phe Arg Val Leu Arg Ala Leu Lys Thr Ile Ser Val<br>220 225 230     | 846  |
| att tca ggg ctg aag acc atc gtg ggg gcc ctg atc cag tct gtg aag<br>Ile Ser Gly Leu Lys Thr Ile Val Gly Ala Leu Ile Gln Ser Val Lys<br>235 240 245     | 894  |
| aag ctg gct gat gtg atg gtc ctc aca gtc ttc tgc ctc agc gtc ttt<br>Lys Leu Ala Asp Val Met Val Leu Thr Val Phe Cys Leu Ser Val Phe<br>250 255 260     | 942  |
| gcc ctc atc ggc ctg cag ctc ttc atg ggc aac cta agg cac aag tgt<br>Ala Leu Ile Gly Leu Gln Leu Phe Met Gly Asn Leu Arg His Lys Cys<br>265 270 275 280 | 990  |
| gtg cgc aac ttc aca gcg ctc aac gcc acc aac gcc tcc gtg gag gcc<br>Val Arg Asn Phe Thr Ala Leu Asn Gly Thr Asn Gly Ser Val Glu Ala<br>285 290 295     | 1038 |
| gac ggc ttg gtc tgg gaa tcc ctg gac ctt tac ctc agt gat cca gaa<br>Asp Gly Leu Val Trp Glu Ser Leu Asp Leu Tyr Leu Ser Asp Pro Glu<br>300 305 310     | 1086 |
| aat tac ctg ctc aag aac gcc acc tct gat gtg tta ctg tgt ggg aac<br>Asn Tyr Leu Leu Lys Asn Gly Thr Ser Asp Val Leu Leu Cys Gly Asn<br>315 320 325     | 1134 |
| agc tct gac gct ggg aca tgt ccg gag gcc tac cgg tgc cta aag gca<br>Ser Ser Asp Ala Gly Thr Cys Pro Glu Gly Tyr Arg Cys Leu Lys Ala<br>330 335 340     | 1182 |

WO 02/08381

PCT/US01/22639

3

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ggc gag aac ccc gac cac ggc tac acc agc ttc gat tcc ttt gcc tgg<br>Gly Glu Asn Pro Asp His Gly Tyr Thr Ser Phe Asp Ser Phe Ala Trp<br>345 350 355 360 | 1230 |
| gcc ttt ctt gca ctc ttc cgc ctg atg acg cag gac tgc tgg gag cgc<br>Ala Phe Leu Ala Leu Phe Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Trp Glu Arg<br>365 370 375     | 1278 |
| ctc tat cag cag acc ctc agg tcc gca ggg aag atc tac atg atc ttc<br>Leu Tyr Gln Gln Thr Leu Arg Ser Ala Gly Lys Ile Tyr Met Ile Phe<br>380 385 390     | 1326 |
| ttc atg ctt gtc atc ttc ctg ggg tcc ttc tac ctg gtg aac ctg atc<br>Phe Met Leu Val Ile Phe Leu Gly Ser Phe Tyr Leu Val Asn Leu Ile<br>395 400 405     | 1374 |
| ctg gcc gtg gtc gca atg gcc tat gag gag caa aac caa gcc acc atc<br>Leu Ala Val Val Ala Met Ala Tyr Glu Glu Gln Asn Gln Ala Thr Ile<br>410 415 420     | 1422 |
| gct gag acc gag gag aag gaa aag cgc ttc cag gag gcc atg gaa atg<br>Ala Glu Thr Glu Glu Lys Glu Lys Arg Phe Gln Glu Ala Met Glu Met<br>425 430 435 440 | 1470 |
| ctc aag aaa gaa cac gag gcc ctc acc atc agg ggt gtg gat acc gtg<br>Leu Lys Lys Glu His Glu Ala Leu Thr Ile Arg Gly Val Asp Thr Val<br>445 450 455     | 1518 |
| tcc cgt agc tcc ttg gag atg tcc cct ttg gcc cca gta aac agc cat<br>Ser Arg Ser Ser Leu Glu Met Ser Pro Leu Ala Pro Val Asn Ser His<br>460 465 470     | 1566 |
| gag aga aga agc aag agg aga aaa cgg atg tct tca gga act gag gag<br>Glu Arg Arg Ser Lys Arg Arg Lys Arg Met Ser Ser Gly Thr Glu Glu<br>475 480 485     | 1614 |
| tgt ggg gag gac agg ctc ccc aag tct gac tca gaa gat ggt ccc aga<br>Cys Gly Glu Asp Arg Leu Pro Lys Ser Asp Ser Glu Asp Gly Pro Arg<br>490 495 500     | 1662 |
| gca atg aat cat ctc agc ctc acc cgt ggc ctc agc agg act tct atg<br>Ala Met Asn His Leu Ser Leu Thr Arg Gly Leu Ser Arg Thr Ser Met<br>505 510 515 520 | 1710 |
| aag cca cgt tcc agc cgc ggg agc att ttc acc ttt cgc agg cga gac<br>Lys Pro Arg Ser Ser Arg Gly Ser Ile Phe Thr Phe Arg Arg Asp<br>525 530 535         | 1758 |
| ctg ggt tct gaa gca gat ttt gca gat gat gaa aac agc aca gcg cgg<br>Leu Gly Ser Glu Ala Asp Phe Ala Asp Asp Glu Asn Ser Thr Ala Arg<br>540 545 550     | 1806 |
| gag agc gag agc cac cac aca tca ctg ctg gtg ccc tgg ccc ctg cgc<br>Glu Ser Glu Ser His His Thr Ser Leu Leu Val Pro Trp Pro Leu Arg<br>555 560 565     | 1854 |
| cgg acc agt gcc cag gga cag ccc agt ccc gga acc tgg gct cct ggc<br>Arg Thr Ser Ala Gln Gly Gln Pro Ser Pro Gly Thr Ser Ala Pro Gly<br>570 575 580     | 1902 |
| cac gcc ctc cat ggc aaa aag aac agc act gtg gac tgc aat ggg gtg<br>His Ala Leu His Gly Lys Lys Asn Ser Thr Val Asp Cys Asn Gly Val<br>585 590 595 600 | 1950 |

WO 02/08381

PCT/US01/22639

4

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| gtc tca tta ctg ggg gca ggc gac cca gag gcc aca tcc cca gga agc<br>Val Ser Leu Leu Gly Ala Gly Asp Pro Glu Ala Thr Ser Pro Gly Ser<br>605 610 615     | 1998 |
| cac ctc ctc cgc cct gtg atg cta gag cac cgg coa gac acg acc acg<br>His Leu Leu Arg Pro Val Met Leu Glu His Pro Pro Asp Thr Thr Thr<br>620 625 630     | 2046 |
| cca tcg gag gag cca ggc ggc ccc cag atg ctg acc tcc cag gct cgg<br>Pro Ser Glu Glu Pro Gly Gly Pro Gln Met Leu Thr Ser Gln Ala Pro<br>635 640 645     | 2094 |
| tgt gta gat ggc ttc gag gag cca gga gca cgg cag cgg gcc ctc agc<br>Cys Val Asp Gly Phe Glu Glu Pro Gly Ala Arg Gln Arg Ala Leu Ser<br>650 655 660     | 2142 |
| gca gtc agc gtc ctc aca agc gca ctg gaa gag tta gag gag tct cgc<br>Ala Val Ser Val Leu Thr Ser Ala Leu Glu Glu Leu Glu Ser Arg<br>665 670 675 680     | 2190 |
| cac aag tgt cca cca tgc tgg aac cgt ctc gcc cag cgc tac ctg atc<br>His Lys Cys Pro Pro Cys Trp Asn Arg Leu Ala Gln Arg Tyr Leu Ile<br>685 690 695     | 2238 |
| tgg gag tgc tgc cgc ctg tgg atg tcc atc aag cag gga gtg aag ttg<br>Trp Glu Cys Cys Pro Leu Trp Met Ser Ile Lys Gln Gly Val Lys Leu<br>700 705 710     | 2286 |
| gtg gtc atg gac cgc ttt act gac ctc acc atc act atg tgc atc gta<br>Val Val Met Asp Pro Phe Thr Asp Leu Thr Ile Thr Met Cys Ile Val<br>715 720 725     | 2334 |
| ctc aac aca ctc ttc atg ggc ctg gag cac tac aac atg aca agt gaa<br>Leu Asn Thr Leu Phe Met Ala Leu Glu His Tyr Asn Met Thr Ser Glu<br>730 735 740     | 2382 |
| ttc gag gag atg ctg cag gtc gga aac ctg gtc ttc aca ggg att ttc<br>Phe Glu Glu Met Leu Gln Val Gly Asn Leu Val Phe Thr Gly Ile Phe<br>745 750 755 760 | 2430 |
| aca gca gag atg acc ttc aag atc att gcc ctc gac ccc tac tac tac<br>Thr Ala Glu Met Thr Phe Lys Ile Ile Ala Leu Asp Pro Tyr Tyr Tyr<br>765 770 775     | 2478 |
| ttc caa cag ggc tgg aac atc ttc gac agc atc atc gtc atc ctt agc<br>Phe Gln Gln Gly Trp Asn Ile Phe Asp Ser Ile Ile Val Ile Leu Ser<br>780 785 790     | 2526 |
| ctc atg gag ctg ggc ctg tcc cgc atg agc aac ttg tcg gtg ctg cgc<br>Leu Met Glu Leu Gly Leu Ser Arg Met Ser Asn Leu Ser Val Leu Arg<br>795 800 805     | 2574 |
| tcc ttc cgc ctg ctg cgg gtc ttc aag ctg gcc aaa tca tgg ccc acc<br>Ser Phe Arg Leu Leu Arg Val Phe Lys Leu Ala Lys Ser Trp Pro Thr<br>810 815 820     | 2622 |
| ctg aac aca ctc atc aag atc atc ggg aac tca gtg ggg gca ctg ggg<br>Leu Asn Thr Leu Ile Lys Ile Ile Gly Asn Ser Val Gly Ala Leu Gly<br>825 830 835 840 | 2670 |
| aac ctg aca ctg gtg cta gcc atc atc gtg ttc atc ttt gct gtg gtg<br>Asn Leu Thr Leu Val Leu Ala Ile Ile Val Phe Ile Phe Ala Val Val<br>845 850 855     | 2718 |

WO 02/08381

PCT/US01/22639

5

|                                                                                                                                                        |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ggc atg cag ctc ttt ggc aag aac tac tgc gag ctg agg gac agc gac<br>Gly Met Gln Leu Phe Gly Lys Asn Tyr Ser Glu Leu Arg Asp Ser Asp<br>860 865 870      | 2766 |
| tca ggc ctg ctg cct cgc tgg cac atg atg gac ttc ttt cat gcc ttc<br>Ser Gly Leu Leu Pro Arg Trp His Met Met Asp Phe Phe His Ala Phe<br>875 880 885      | 2814 |
| cta atc atc ttc cgc atc ctc tgt gga gag tgg atc gag acc atg tgg<br>Leu Ile Ile Phe Arg Ile Leu Cys Gly Glu Trp Ile Glu Thr Met Trp<br>890 895 900      | 2862 |
| gac tgc atg gag gtg tgc ggg cag tca tta tgc ctg ctg gtc ttc ttg<br>Asp Cys Met Glu Val Ser Gly Gln Ser Leu Cys Leu Leu Val Phe Leu<br>905 910 915 920  | 2910 |
| ctt gtt atg gtc att ggc aac ctt gtg gtc ctg aat ctc ttc ctg gcc<br>Leu Val Met Val Ile Gly Asn Leu Val Val Leu Asn Leu Phe Leu Ala<br>925 930 935      | 2958 |
| ttg ctg ctc agc tcc ttc agt gca gac aac ctc aca gcc cct gat gag<br>Leu Leu Leu Ser Ser Phe Ser Ala Asp Asn Leu Thr Ala Pro Asp Glu<br>940 945 950      | 3006 |
| gac aga gag atg aac aac ctc cag ctg gcc ctg gcc cgc atc cag agg<br>Asp Arg Glu Met Asn Asn Leu Gln Leu Ala Leu Ala Arg Ile Gln Arg<br>955 960 965      | 3054 |
| ggc ctg cgc ttt gtc aag cgg acc acc tgg gat ttc tgc tgt ggt ctc<br>Gly Leu Arg Phe Val Lys Arg Thr Thr Trp Asp Phe Cys Cys Gly Leu<br>970 975 980      | 3102 |
| ctg cgg cac cgg cct cag aag ccc gca gcc ctt gcc gcc cag gcc cag<br>Leu Arg His Arg Pro Gln Lys Pro Ala Ala Leu Ala Ala Gln Gly Gln<br>985 990 995 1000 | 3150 |
| ctg ccc agc tgc att gcc acc ccc tac tcc ccg cca ccc cca gag<br>Leu Pro Ser Cys Ile Ala Thr Pro Tyr Ser Pro Pro Pro Pro Glu<br>1005 1010 1015           | 3195 |
| acg gag aag gtg cct ccc acc cgc aag gaa aca cag ttt gag gaa<br>Thr Glu Lys Val Pro Pro Thr Arg Lys Glu Thr Gln Phe Glu Glu<br>1020 1025 1030           | 3240 |
| ggc gag caa cca gcc cag gcc acc ccc ggg gat cca gag ccc gtg<br>Gly Glu Gln Pro Gly Gln Gly Thr Pro Gly Asp Pro Glu Pro Val<br>1035 1040 1045           | 3285 |
| tgt gtg ccc atc gct gtg gcc gag tca gac aca gat gac caa gaa<br>Cys Val Pro Ile Ala Val Ala Glu Ser Asp Thr Asp Asp Gln Glu<br>1050 1055 1060           | 3330 |
| gag gat gag gag aac agc ctg gcc acg gag gag gag tcc agc aag<br>Glu Asp Glu Glu Asn Ser Leu Gly Thr Glu Glu Glu Ser Ser Lys<br>1065 1070 1075           | 3375 |
| cag cag gaa tcc cag cct gtg tcc gcc tgg ccc aga gcc cct ccg<br>Gln Gln Glu Ser Gln Pro Val Ser Gly Trp Pro Arg Gly Pro Pro<br>1080 1085 1090           | 3420 |
| gat tcc agg acc tgg agc cag gtg tca gcg act gcc tcc tct gag<br>Asp Ser Arg Thr Trp Ser Gln Val Ser Ala Thr Ala Ser Ser Glu<br>1095 1100 1105           | 3465 |

WO 02/08381

PCT/US01/22639

6

|                                                    |                                                    |                                                    |      |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------|
| gcc gag gcc agt gca<br>Ala Glu Ala Ser Ala<br>1110 | tct cag gcc gac tgg<br>Ser Gln Ala Asp Trp<br>1115 | cgg cag cag tgg aaa<br>Arg Gln Gln Trp Lys<br>1120 | 3510 |
| gcg gaa ccc cag gcc<br>Ala Glu Pro Gln Ala<br>1125 | cca ggg tgc ggt gag<br>Pro Gly Cys Gly Glu<br>1130 | acc cca gag gac agt<br>Thr Pro Glu Asp Ser<br>1135 | 3555 |
| tgc tcc gag ggc agc<br>Cys Ser Glu Gly Ser<br>1140 | aca gca gac atg acc<br>Thr Ala Asp Met Thr<br>1145 | aac acc gct gag ctc<br>Asn Thr Ala Glu Leu<br>1150 | 3600 |
| ctg gag cag atc cct<br>Leu Glu Gln Ile Pro<br>1155 | gac ctc ggc cag gat<br>Asp Leu Gly Gln Asp<br>1160 | gtc aag gac cca gag<br>Val Lys Asp Pro Glu<br>1165 | 3645 |
| gac tgc ttc act gaa<br>Asp Cys Phe Thr Glu<br>1170 | ggc tgt gtc cgg cgc<br>Gly Cys Val Arg Arg<br>1175 | tgt ccc tgc tgt gcg<br>Cys Pro Cys Cys Ala<br>1180 | 3690 |
| gtg gac acc aca cag<br>Val Asp Thr Thr Gln<br>1185 | gcc cca ggg aag gtc<br>Ala Pro Gly Lys Val<br>1190 | tgg tgg cgg ttg cgc<br>Trp Trp Arg Leu Arg<br>1195 | 3735 |
| aag acc tgc tac cac<br>Lys Thr Cys Tyr His<br>1200 | atc gtg gag cac agc<br>Ile Val Glu His Ser<br>1205 | tgg ttc gag aca ttc<br>Trp Phe Glu Thr Phe<br>1210 | 3780 |
| atc atc ttc atg atc<br>Ile Ile Phe Met Ile<br>1215 | cta ctc agc agt gga<br>Leu Leu Ser Ser Gly<br>1220 | gcg ctg gcc ttc gag<br>Ala Leu Ala Phe Glu<br>1225 | 3825 |
| gac atc tac cta gag<br>Asp Ile Tyr Leu Glu<br>1230 | gag cgg aag acc atc<br>Glu Arg Lys Thr Ile<br>1235 | aag gtt ctg ctt gag<br>Lys Val Leu Leu Glu<br>1240 | 3870 |
| tat gcc gac aag atg<br>Tyr Ala Asp Lys Met<br>1245 | ttc aca tat gtc ttc<br>Phe Thr Tyr Val Phe<br>1250 | gtg ctg gag atg ctg<br>Val Leu Glu Met Leu<br>1255 | 3915 |
| ctc aag tgg gtg gcc<br>Leu Lys Trp Val Ala<br>1260 | tac ggc ttc aag aag<br>Tyr Gly Phe Lys Lys<br>1265 | tac ttc acc aat gcc<br>Tyr Phe Thr Asn Ala<br>1270 | 3960 |
| tgg tgc tgg ctc gac<br>Trp Cys Trp Leu Asp<br>1275 | ttc ctc atc gta gac<br>Phe Leu Ile Val Asp<br>1280 | gtc tct ctg gtc agc<br>Val Ser Leu Val Ser<br>1285 | 4005 |
| ctg gtg gcc aac acc<br>Leu Val Ala Asn Thr<br>1290 | ctg ggc ttt gcc gag<br>Leu Gly Phe Ala Glu<br>1295 | atg ggc ccc atc aag<br>Met Gly Pro Ile Lys<br>1300 | 4050 |
| tca ctg cgg acg ctg<br>Ser Leu Arg Thr Leu<br>1305 | cgt gca ctc cgt cct<br>Arg Ala Leu Arg Pro<br>1310 | ctg aga gct ctg tca<br>Leu Arg Ala Leu Ser<br>1315 | 4095 |
| cga ttt gag ggc atg<br>Arg Phe Glu Gly Met<br>1320 | agg gtg gtg gtc aat<br>Arg Val Val Val Asn<br>1325 | gcc ctg gtg ggc gcc<br>Ala Leu Val Gly Ala<br>1330 | 4140 |
| atc ccg tcc atc atg<br>Ile Pro Ser Ile Met<br>1335 | aac gtc ctc ctc gtc<br>Asn Val Leu Leu Val<br>1340 | tgc ctc atc ttc tgg<br>Cys Leu Ile Phe Trp<br>1345 | 4185 |

WO 02/08381

PCT/US01/22639

7

|                                                    |                                                    |                                                    |      |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------|
| ctc atc ttc agc atc<br>Leu Ile Phe Ser Ile<br>1350 | atg ggc gtg aac ctc<br>Met Gly Val Asn Leu<br>1355 | ttt gcg ggg aag ttt<br>Phe Ala Gly Lys Phe<br>1360 | 4230 |
| ggg agg tgc atc aac<br>Gly Arg Cys Ile Asn<br>1365 | cag aca gag gga gac<br>Gln Thr Glu Gly Asp<br>1370 | ttg cct ttg aac tac<br>Leu Pro Leu Asn Tyr<br>1375 | 4275 |
| acc atc gtg aac aac<br>Thr Ile Val Asn Asn<br>1380 | aag agc cag tgt gag<br>Lys Ser Gln Cys Glu<br>1385 | tcc ttg aac ttg acc<br>Ser Leu Asn Leu Thr<br>1390 | 4320 |
| gga gaa ttg tac tgg<br>Gly Glu Leu Tyr Trp<br>1395 | acc aag gtg aaa gtc<br>Thr Lys Val Lys Val<br>1400 | aac ttt gac aac gtg<br>Asn Phe Asp Asn Val<br>1405 | 4365 |
| ggg gcc ggg tac ctg<br>Gly Ala Gly Tyr Leu<br>1410 | gcc ctt ctg cag gtg<br>Ala Leu Leu Gln Val<br>1415 | gca aca ttt aaa ggc<br>Ala Thr Phe Lys Gly<br>1420 | 4410 |
| tgg atg gac att atg<br>Trp Met Asp Ile Met<br>1425 | tat gca gct gtg gac<br>Tyr Ala Ala Val Asp<br>1430 | tcc agg ggg tat gaa<br>Ser Arg Gly Tyr Glu<br>1435 | 4455 |
| gag cag cct cag tgg<br>Glu Gln Pro Gln Trp<br>1440 | gaa tac aac ctc tac<br>Glu Tyr Asn Leu Tyr<br>1445 | atg tac atc tat ttt<br>Met Tyr Ile Tyr Phe<br>1450 | 4500 |
| gtc att ttc atc atc<br>Val Ile Phe Ile Ile<br>1455 | ttt ggg tet ttc ttc<br>Phe Gly Ser Phe Phe<br>1460 | acc ctg aac ctc ttt<br>Thr Leu Asn Leu Phe<br>1465 | 4545 |
| att ggt gtc atc att<br>Ile Gly Val Ile Ile<br>1470 | gac aac ttc aac caa<br>Asp Asn Phe Asn Gln<br>1475 | cag aag aaa aag tta<br>Gln Lys Lys Lys Leu<br>1480 | 4590 |
| ggg ggc cag gac atc<br>Gly Gly Gln Asp Ile<br>1485 | ttc atg aca gag gag<br>Phe Met Thr Glu Glu<br>1490 | cag aag aag tac tac<br>Gln Lys Lys Tyr Tyr<br>1495 | 4635 |
| aat gcc atg aag aag<br>Asn Ala Met Lys Lys<br>1500 | ctg ggc tcc aag aag<br>Leu Gly Ser Lys Lys<br>1505 | ccc cag aag ccc atc<br>Pro Gln Lys Pro Ile<br>1510 | 4680 |
| cca cgg ccc ctg aac<br>Pro Arg Pro Leu Asn<br>1515 | aag tac cag ggc ttc<br>Lys Tyr Gln Gly Phe<br>1520 | ata ttc gac att gtg<br>Ile Phe Asp Ile Val<br>1525 | 4725 |
| acc aag cag gcc ttt<br>Thr Lys Gln Ala Phe<br>1530 | gac gtc acc atc atg<br>Asp Val Thr Ile Met<br>1535 | ttt ctg atc tgc ttg<br>Phe Leu Ile Cys Leu<br>1540 | 4770 |
| aat atg gtg acc atg<br>Asn Met Val Thr Met<br>1545 | atg gtg gag aca gat<br>Met Val Glu Thr Asp<br>1550 | gac caa agt cct gag<br>Asp Gln Ser Pro Glu<br>1555 | 4815 |
| aaa atc aac atc ttg<br>Lys Ile Asn Ile Leu<br>1560 | gcc aag atc aac ctg<br>Ala Lys Ile Asn Leu<br>1565 | ctc ttt gtg gcc atc<br>Leu Phe Val Ala Ile<br>1570 | 4860 |
| ttc aca ggc gag tgt<br>Phe Thr Gly Glu Cys<br>1575 | att gtc aag ctg gct<br>Ile Val Lys Leu Ala<br>1580 | gcc ctg cgc cac tac<br>Ala Leu Arg His Tyr<br>1585 | 4905 |

WO 02/08381

PCT/US01/22639

8

|                     |                     |                     |      |
|---------------------|---------------------|---------------------|------|
| tac ttc acc aac agc | tgg aat atc ttc gac | ttc gtg gtt gtc atc | 4950 |
| Tyr Phe Thr Asn Ser | Trp Asn Ile Phe Asp | Phe Val Val Val Ile |      |
| 1590                | 1595                | 1600                |      |
| ctc tcc atc gtg ggc | act gtg ctc tcg gac | atc atc cag aag tac | 4995 |
| Leu Ser Ile Val Gly | Thr Val Leu Ser Asp | Ile Ile Gln Lys Tyr |      |
| 1605                | 1610                | 1615                |      |
| ttc ttc tcc cgg acg | ctc ttc cga gtc atc | cgc ctg gcc cga ata | 5040 |
| Phe Phe Ser Pro Thr | Leu Phe Arg Val Ile | Arg Leu Ala Arg Ile |      |
| 1620                | 1625                | 1630                |      |
| ggc cgc atc ctc aga | ctg atc cga ggg gcc | aag ggg atc cgc acg | 5085 |
| Gly Arg Ile Leu Arg | Leu Ile Arg Gly Ala | Lys Gly Ile Arg Thr |      |
| 1635                | 1640                | 1645                |      |
| ctg ctc ttt gcc ctc | atg atg tcc ctg cct | gcc ctc ttc aac atc | 5130 |
| Leu Leu Phe Ala Leu | Met Met Ser Leu Pro | Ala Leu Phe Asn Ile |      |
| 1650                | 1655                | 1660                |      |
| ggg ctg ctg ctc ttc | ctc gtc atg ttc atc | tac tcc atc ttt ggc | 5175 |
| Gly Leu Leu Leu Phe | Leu Val Met Phe Ile | Tyr Ser Ile Phe Gly |      |
| 1665                | 1670                | 1675                |      |
| atg gcc aac ttc gct | tat gtc aag tgg gag | gct gcc atc gac gac | 5220 |
| Met Ala Asn Phe Ala | Tyr Val Lys Trp Glu | Ala Gly Ile Asp Asp |      |
| 1680                | 1685                | 1690                |      |
| atg ttc aac ttc cag | acc ttc gcc aac agc | atg ctg tgc ctc ttc | 5265 |
| Met Phe Asn Phe Gln | Thr Phe Ala Asn Ser | Met Leu Cys Leu Phe |      |
| 1695                | 1700                | 1705                |      |
| cag atc acc acg tcg | gcc ggc tgg gat ggc | ctc ctc agc ccc atc | 5310 |
| Gln Ile Thr Thr Ser | Ala Gly Trp Asp Gly | Leu Leu Ser Pro Ile |      |
| 1710                | 1715                | 1720                |      |
| ctc aac act ggg cgg | ccc tac tgc gac ccc | act ctg ccc aac agc | 5355 |
| Leu Asn Thr Gly Pro | Pro Tyr Cys Asp Pro | Thr Leu Pro Asn Ser |      |
| 1725                | 1730                | 1735                |      |
| aat ggc tct cgg ggg | gac tgc ggg agc cca | gcc gtg gcc atc ctc | 5400 |
| Asn Gly Ser Arg Gly | Asp Cys Gly Ser Pro | Ala Val Gly Ile Leu |      |
| 1740                | 1745                | 1750                |      |
| ttc ttc acc aoc tac | atc atc atc tcc ttc | ctc atc gtg gtc aac | 5445 |
| Phe Phe Thr Thr Tyr | Ile Ile Ile Ser Phe | Leu Ile Val Val Asn |      |
| 1755                | 1760                | 1765                |      |
| atg tac att gcc atc | atc ctg gag aac ttc | agc gtg gcc acg gag | 5490 |
| Met Tyr Ile Ala Ile | Ile Leu Glu Asn Phe | Ser Val Ala Thr Glu |      |
| 1770                | 1775                | 1780                |      |
| gag agc acc gag ccc | ctg agt gag gac gac | ttc gat atg ttc tat | 5535 |
| Glu Ser Thr Glu Pro | Leu Ser Glu Asp Asp | Phe Asp Met Phe Tyr |      |
| 1785                | 1790                | 1795                |      |
| gag atc tgg gag aaa | ttt gac cca gag gcc | act cag ttt att gag | 5580 |
| Glu Ile Trp Glu Lys | Phe Asp Pro Glu Ala | Thr Gln Phe Ile Glu |      |
| 1800                | 1805                | 1810                |      |
| tat tcg gtc ctg tct | gac ttt gcc gac gcc | ctg tct gag cca ctc | 5625 |
| Tyr Ser Val Leu Ser | Asp Phe Ala Asp Ala | Leu Ser Glu Pro Leu |      |
| 1815                | 1820                | 1825                |      |

WO 02/08381

PCT/US01/22639

9

|                                                                                                                                              |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| cgt atc gcc aag ccc aac cag ata agc ctc atc aac atg gac ctg<br>Arg Ile Ala Lys Pro Asn Gln Ile Ser Leu Ile Asn Met Asp Leu<br>1830 1835 1840 | 5670 |
| ccc atg gtg agt ggg gac cgc atc cat tgc atg gac att ctc ttt<br>Pro Met Val Ser Gly Asp Arg Ile His Cys Met Asp Ile Leu Phe<br>1845 1850 1855 | 5715 |
| gcc ttc acc aaa agg gtc ctg ggg gag tct ggg gag atg gac gcc<br>Ala Phe Thr Lys Arg Val Leu Gly Glu Ser Gly Glu Met Asp Ala<br>1860 1865 1870 | 5760 |
| ctg aag atc cag atg gag gag aag ttc atg gca gcc aac cca tcc<br>Leu Lys Ile Gln Met Glu Glu Lys Phe Met Ala Ala Asn Pro Ser<br>1875 1880 1885 | 5805 |
| aag atc tcc tac gag ccc atc acc acc aca ctc cgg cgc aag cac<br>Lys Ile Ser Tyr Glu Pro Ile Thr Thr Leu Arg Arg Lys His<br>1890 1895 1900     | 5850 |
| gaa gag gtg tcc gcc atg gtt atc cag aga gcc ttc cgc agg cac<br>Glu Glu Val Ser Ala Met Val Ile Gln Arg Ala Phe Arg Arg His<br>1905 1910 1915 | 5895 |
| ctg ctg caa cgc tct ttg aag cat gcc tcc ttc ctc ttc cgt cag<br>Leu Leu Gln Arg Ser Leu Lys His Ala Ser Phe Leu Phe Arg Gln<br>1920 1925 1930 | 5940 |
| cag cgc ggc agc ggc ctc tcc gaa gag gat gcc cct gag cga gag<br>Gln Ala Gly Ser Gly Leu Ser Glu Glu Asp Ala Pro Glu Arg Glu<br>1935 1940 1945 | 5985 |
| ggc ctc atc gcc tac gtg atg agt gag aac ttc tcc cga ccc ctt<br>Gly Leu Ile Ala Tyr Val Met Ser Glu Asn Phe Ser Arg Pro Leu<br>1950 1955 1960 | 6030 |
| ggc cca ccc tcc agc tcc tcc atc tcc tcc act tcc ttc cca ccc<br>Gly Pro Pro Ser Ser Ser Ser Ile Ser Ser Thr Ser Phe Pro Pro<br>1965 1970 1975 | 6075 |
| tcc tat gac agt gtc act aga gcc acc agc gat aac ctc cag gtg<br>Ser Tyr Asp Ser Val Thr Arg Ala Thr Ser Asp Asn Leu Gln Val<br>1980 1985 1990 | 6120 |
| cgg ggg tct gac tac agc cac agt gaa gat ctc gcc gac ttc ccc<br>Arg Gly Ser Asp Tyr Ser His Ser Glu Asp Leu Ala Asp Phe Pro<br>1995 2000 2005 | 6165 |
| cct tct ccg gac agg gac cgt gag tcc atc gtg tgagcctcgg<br>Pro Ser Pro Asp Arg Asp Arg Glu Ser Ile Val<br>2010 2015                           | 6208 |
| cctggctggc caggacacac tgaaaagcag cttttttcac catggcaaac ctaaatgcag                                                                            | 6268 |
| tcagtcacaa accagcctgg ggccttctg getttgggag taagaaatgg gcctcggccc                                                                             | 6328 |
| cgcggatcaa ccaggcagag ttctgtggcg ccgcgtggac agccggagca gttggcctgt                                                                            | 6388 |
| gcttgagggc ctcaataga cctgtgacct ggtctggtca ggcaatgccc ctgcggctct                                                                             | 6448 |
| ggaaagcaac ttcatccag ctgctgaggc gaaatataaa actgagactg tatatgttgt                                                                             | 6508 |
| gaatgggctt tcataaattt attatatttg atattttttt acttgagcaa agaactaagg                                                                            | 6568 |

WO 02/08381

PCT/US01/22639

10

```

atttttccat ggacatgggc agcaattcac gctgtctctt cttaccctg aacaagagt 6628
tctatggagc agccgggaagt ctgttctcaa agcagaagtg gaatccagt tggctccac 6688
aggtcttcaa tgcccagggg tcgaatgggg tcccctccc acttgacctg agatgctggg 6748
agggctgaac cccactcac acaagcacac acacacacag tctcacaaca cggaggccag 6808
acacaggccg tgggaccocag gctccagcc taaggagagc aggcctttcc ctgcccggcc 6868
ccaaggatg gggttcttgt ccacggggct cactctggcc cctattgtc tcccaaggtc 6928
ccattttccc ccttgtgttt tcacgcaggt catattgtca gtctacaaa aataaaaggo 6988
ttocaggaga gaggggcctg gggctccagg gctgggcnt aggcactgat agttgcttt 7048
tcttcccctc ctgtaagagt attaacaaaa ccaaggaca caagggtga agcccatto 7108
acggcctggc atgcagcttg tcttctctcc tggaaactgg caggcctgc cagccagcca 7168
atggaagaga ggggctgagc catgggggtt tggggctaag aagttcacca gccctgagcc 7228
atggsnccc tcagctggcc tgaagagagg aaactggcga tctccaggg ctctctggac 7288
catacnogga ggagttttct nggtgtgtct ccagctctcc tccagacaca gagacatggg 7348
agtggggagc ggacgttggc cctggccctg tgcagggaaa gggatgtca gcccagttc 7408
tcgtgccctc tagaggggaa tgaacctagg cacttttag agagggggca ctgtgtcag 7468
gccagcctc tctggcnng tccgggac ctgatggcac ccacacagag gaactctttg 7528
gggcaagac caggtggntc ccataggtct tgtgaaaagg ctttttcagg gaaaaatatt 7588
ttactagtcc aatcacccc aggaactctt cagctgctga caatcctatt tagcatatgc 7648
aaatctttaa acatagagaa ctgtcacccg gagtaacag ggtcaactgg cgaagagcag 7708
gccagggggc ttgctgnnc cattccagct ctncacnga nnnctccwm nnnnnnncat 7768
nnctccagg ccacctcagt ctcanctgcc ggctctgggc tggctnctcc taacctacct 7828
nnccagagctc tcggagggct ggacatttgt ggcagtgtctg aanggggcat tgsnggcgag 7888
taaagtatta kgtttctct tgtcacocca gttcccttgg tggcaacccc agaccaaccc 7948
catgcccctg acagatctag ttctcttcts ctgtgttccc tttagtccn gtgtgggaca 8008
cggtttaact gtcccagoga gatttctcca agtnгааatc ctatttttgt agatctccat 8068
gctttgnctc tcaaggcttg gagaggtatg tgcocctcct nggbnctcag cgcctgctac 8128
acaggcagga atgoggnntg ggaggcaggt cgggctssna gccagctgg ccggaaggag 8188
actgtggttt ttgtgtgtgt ggacagcnog ggagctttga gacagntgc ctggggctgg 8248
ctgcagacgg tgtgttggg ggtgggaggt gagctagacc nnncccttag cttttagcct 8308
ggctgtcacc tttttaattt ccagaactgc acaatgacca gnaggagggg agaagagagt 8368
aggaaaaagg aggggaaggac agacatcaag tgccagatgt tgtctgaact aatcgagcac 8428
ttctaccaca acttcnngta taaataaaat acatannng gggcaaccca ataatggct 8488

```

WO 02/08381

PCT/US01/22639

11

tac

8491

<210> 2  
<211> 2016  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 2

Met Ala Asn Phe Leu Leu Pro Arg Gly Thr Ser Ser Phe Arg Arg Phe  
1 5 10 15  
Thr Arg Glu Ser Leu Ala Ala Ile Glu Lys Arg Met Ala Glu Lys Gln  
20 25 30  
Ala Arg Gly Ser Thr Thr Leu Gln Glu Ser Arg Glu Gly Leu Pro Glu  
35 40 45  
Glu Glu Ala Pro Arg Pro Gln Leu Asp Leu Gln Ala Ser Lys Lys Leu  
50 55 60  
Pro Asp Leu Tyr Gly Asn Pro Pro Gln Glu Leu Ile Gly Glu Pro Leu  
65 70 75 80  
Glu Asp Leu Asp Pro Phe Tyr Ser Thr Gln Lys Thr Phe Ile Val Leu  
85 90 95  
Asn Lys Gly Lys Thr Ile Phe Arg Phe Ser Ala Thr Asn Ala Leu Tyr  
100 105 110  
Val Leu Ser Pro Phe His Pro Val Arg Arg Ala Ala Val Lys Ile Leu  
115 120 125  
Val His Ser Leu Phe Asn Met Leu Ile Met Cys Thr Ile Leu Thr Asn  
130 135 140  
Cys Val Phe Met Ala Gln His Asp Pro Pro Pro Trp Thr Lys Tyr Val  
145 150 155 160  
Glu Tyr Thr Phe Thr Ala Ile Tyr Thr Phe Glu Ser Leu Val Lys Ile  
165 170 175  
Leu Ala Arg Ala Phe Cys Leu His Ala Phe Thr Phe Leu Arg Asp Pro  
180 185 190  
Trp Asn Trp Leu Asp Phe Ser Val Ile Ile Met Ala Tyr Thr Thr Glu  
195 200 205

WO 02/08381

PCT/US01/22639

12

Phe Val Asp Leu Gly Asn Val Ser Ala Leu Arg Thr Phe Arg Val Leu  
210 215 220

Arg Ala Leu Lys Thr Ile Ser Val Ile Ser Gly Leu Lys Thr Ile Val  
225 230 235 240

Gly Ala Leu Ile Gln Ser Val Lys Lys Leu Ala Asp Val Met Val Leu  
245 250 255

Thr Val Phe Cys Leu Ser Val Phe Ala Leu Ile Gly Leu Gln Leu Phe  
260 265 270

Met Gly Asn Leu Arg His Lys Cys Val Arg Asn Phe Thr Ala Leu Asn  
275 280 285

Gly Thr Asn Gly Ser Val Glu Ala Asp Gly Leu Val Trp Glu Ser Leu  
290 295 300

Asp Leu Tyr Leu Ser Asp Pro Glu Asn Tyr Leu Leu Lys Asn Gly Thr  
305 310 315 320

Ser Asp Val Leu Leu Cys Gly Asn Ser Ser Asp Ala Gly Thr Cys Pro  
325 330 335

Glu Gly Tyr Arg Cys Leu Lys Ala Gly Glu Asn Pro Asp His Gly Tyr  
340 345 350

Thr Ser Phe Asp Ser Phe Ala Trp Ala Phe Leu Ala Leu Phe Arg Leu  
355 360 365

Met Thr Gln Asp Cys Trp Glu Arg Leu Tyr Gln Gln Thr Leu Arg Ser  
370 375 380

Ala Gly Lys Ile Tyr Met Ile Phe Phe Met Leu Val Ile Phe Leu Gly  
385 390 395 400

Ser Phe Tyr Leu Val Asn Leu Ile Leu Ala Val Val Ala Met Ala Tyr  
405 410 415

Glu Glu Gln Asn Gln Ala Thr Ile Ala Glu Thr Glu Glu Lys Glu Lys  
420 425 430

Arg Phe Gln Glu Ala Met Glu Met Leu Lys Lys Glu His Glu Ala Leu  
435 440 445

Thr Ile Arg Gly Val Asp Thr Val Ser Arg Ser Ser Leu Glu Met Ser  
450 455 460

WO 02/08381

PCT/US01/22639

13

Pro Leu Ala Pro Val Asn Ser His Glu Arg Arg Ser Lys Arg Arg Lys  
 465 470 475 480  
 Arg Met Ser Ser Gly Thr Glu Glu Cys Gly Glu Asp Arg Leu Pro Lys  
 485 490 495  
 Ser Asp Ser Glu Asp Gly Pro Arg Ala Met Asn His Leu Ser Leu Thr  
 500 505 510  
 Arg Gly Leu Ser Arg Thr Ser Met Lys Pro Arg Ser Ser Arg Gly Ser  
 515 520 525  
 Ile Phe Thr Phe Arg Arg Arg Asp Leu Gly Ser Glu Ala Asp Phe Ala  
 530 535 540  
 Asp Asp Glu Asn Ser Thr Ala Arg Glu Ser Glu Ser His His Thr Ser  
 545 550 555 560  
 Leu Leu Val Pro Trp Pro Leu Arg Arg Thr Ser Ala Gln Gly Gln Pro  
 565 570 575  
 Ser Pro Gly Thr Ser Ala Pro Gly His Ala Leu His Gly Lys Lys Asn  
 580 585 590  
 Ser Thr Val Asp Cys Asn Gly Val Val Ser Leu Leu Gly Ala Gly Asp  
 595 600 605  
 Pro Glu Ala Thr Ser Pro Gly Ser His Leu Leu Arg Pro Val Met Leu  
 610 615 620  
 Glu His Pro Pro Asp Thr Thr Thr Pro Ser Glu Glu Pro Gly Gly Pro  
 625 630 635 640  
 Gln Met Leu Thr Ser Gln Ala Pro Cys Val Asp Gly Phe Glu Glu Pro  
 645 650 655  
 Gly Ala Arg Gln Arg Ala Leu Ser Ala Val Ser Val Leu Thr Ser Ala  
 660 665 670  
 Leu Glu Glu Leu Glu Glu Ser Arg His Lys Cys Pro Pro Cys Trp Asn  
 675 680 685  
 Arg Leu Ala Gln Arg Tyr Leu Ile Trp Glu Cys Cys Pro Leu Trp Met  
 690 695 700  
 Ser Ile Lys Gln Gly Val Lys Leu Val Val Met Asp Pro Phe Thr Asp  
 705 710 715 720

WO 02/08381

PCT/US01/22639

14

Leu Thr Ile Thr Met Cys Ile Val Leu Asn Thr Leu Phe Met Ala Leu  
 725 730 735  
 Glu His Tyr Asn Met Thr Ser Glu Phe Glu Glu Met Leu Gln Val Gly  
 740 745 750  
 Asn Leu Val Phe Thr Gly Ile Phe Thr Ala Glu Met Thr Phe Lys Ile  
 755 760 765  
 Ile Ala Leu Asp Pro Tyr Tyr Tyr Phe Gln Gln Gly Trp Asn Ile Phe  
 770 775 780  
 Asp Ser Ile Ile Val Ile Leu Ser Leu Met Glu Leu Gly Leu Ser Arg  
 785 790 795 800  
 Met Ser Asn Leu Ser Val Leu Arg Ser Phe Arg Leu Leu Arg Val Phe  
 805 810 815  
 Lys Leu Ala Lys Ser Trp Pro Thr Leu Asn Thr Leu Ile Lys Ile Ile  
 820 825 830  
 Gly Asn Ser Val Gly Ala Leu Gly Asn Leu Thr Leu Val Leu Ala Ile  
 835 840 845  
 Ile Val Phe Ile Phe Ala Val Val Gly Met Gln Leu Phe Gly Lys Asn  
 850 855 860  
 Tyr Ser Glu Leu Arg Asp Ser Asp Ser Gly Leu Leu Pro Arg Trp His  
 865 870 875 880  
 Met Met Asp Phe Phe His Ala Phe Leu Ile Ile Phe Arg Ile Leu Cys  
 885 890 895  
 Gly Glu Trp Ile Glu Thr Met Trp Asp Cys Met Glu Val Ser Gly Gln  
 900 905 910  
 Ser Leu Cys Leu Leu Val Phe Leu Leu Val Met Val Ile Gly Asn Leu  
 915 920 925  
 Val Val Leu Asn Leu Phe Leu Ala Leu Leu Leu Ser Ser Phe Ser Ala  
 930 935 940  
 Asp Asn Leu Thr Ala Pro Asp Glu Asp Arg Glu Met Asn Asn Leu Gln  
 945 950 955 960  
 Leu Ala Leu Ala Arg Ile Gln Arg Gly Leu Arg Phe Val Lys Arg Thr  
 965 970 975

WO 02/08381

PCT/US01/22639

15

Thr Trp Asp Phe Cys Cys Gly Leu Leu Arg His Arg Pro Gln Lys Pro  
980 985 990

Ala Ala Leu Ala Ala Gln Gly Gln Leu Pro Ser Cys Ile Ala Thr Pro  
995 1000 1005

Tyr Ser Pro Pro Pro Pro Glu Thr Glu Lys Val Pro Pro Thr Arg  
1010 1015 1020

Lys Glu Thr Gln Phe Glu Glu Gly Glu Gln Pro Gly Gln Gly Thr  
1025 1030 1035

Pro Gly Asp Pro Glu Pro Val Cys Val Pro Ile Ala Val Ala Glu  
1040 1045 1050

Ser Asp Thr Asp Asp Gln Glu Glu Asp Glu Glu Asn Ser Leu Gly  
1055 1060 1065

Thr Glu Glu Glu Ser Ser Lys Gln Gln Glu Ser Gln Pro Val Ser  
1070 1075 1080

Gly Trp Pro Arg Gly Pro Pro Asp Ser Arg Thr Trp Ser Gln Val  
1085 1090 1095

Ser Ala Thr Ala Ser Ser Glu Ala Glu Ala Ser Ala Ser Gln Ala  
1100 1105 1110

Asp Trp Arg Gln Gln Trp Lys Ala Glu Pro Gln Ala Pro Gly Cys  
1115 1120 1125

Gly Glu Thr Pro Glu Asp Ser Cys Ser Glu Gly Ser Thr Ala Asp  
1130 1135 1140

Met Thr Asn Thr Ala Glu Leu Leu Glu Gln Ile Pro Asp Leu Gly  
1145 1150 1155

Gln Asp Val Lys Asp Pro Glu Asp Cys Phe Thr Glu Gly Cys Val  
1160 1165 1170

Arg Arg Cys Pro Cys Cys Ala Val Asp Thr Thr Gln Ala Pro Gly  
1175 1180 1185

Lys Val Trp Trp Arg Leu Arg Lys Thr Cys Tyr His Ile Val Glu  
1190 1195 1200

His Ser Trp Phe Glu Thr Phe Ile Ile Phe Met Ile Leu Leu Ser  
1205 1210 1215

WO 02/08381

PCT/US01/22639

16

Ser Gly Ala Leu Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Leu Glu Glu Arg Lys  
1220 1225 1230  
Thr Ile Lys Val Leu Leu Glu Tyr Ala Asp Lys Met Phe Thr Tyr  
1235 1240 1245  
Val Phe Val Leu Glu Met Leu Leu Lys Trp Val Ala Tyr Gly Phe  
1250 1255 1260  
Lys Lys Tyr Phe Thr Asn Ala Trp Cys Trp Leu Asp Phe Leu Ile  
1265 1270 1275  
Val Asp Val Ser Leu Val Ser Leu Val Ala Asn Thr Leu Gly Phe  
1280 1285 1290  
Ala Glu Met Gly Pro Ile Lys Ser Leu Arg Thr Leu Arg Ala Leu  
1295 1300 1305  
Arg Pro Leu Arg Ala Leu Ser Arg Phe Glu Gly Met Arg Val Val  
1310 1315 1320  
Val Asn Ala Leu Val Gly Ala Ile Pro Ser Ile Met Asn Val Leu  
1325 1330 1335  
Leu Val Cys Leu Ile Phe Trp Leu Ile Phe Ser Ile Met Gly Val  
1340 1345 1350  
Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Gly Arg Cys Ile Asn Gln Thr Glu  
1355 1360 1365  
Gly Asp Leu Pro Leu Asn Tyr Thr Ile Val Asn Asn Lys Ser Gln  
1370 1375 1380  
Cys Glu Ser Leu Asn Leu Thr Gly Glu Leu Tyr Trp Thr Lys Val  
1385 1390 1395  
Lys Val Asn Phe Asp Asn Val Gly Ala Gly Tyr Leu Ala Leu Leu  
1400 1405 1410  
Gln Val Ala Thr Phe Lys Gly Trp Met Asp Ile Met Tyr Ala Ala  
1415 1420 1425  
Val Asp Ser Arg Gly Tyr Glu Glu Gln Pro Gln Trp Glu Tyr Asn  
1430 1435 1440  
Leu Tyr Met Tyr Ile Tyr Phe Val Ile Phe Ile Ile Phe Gly Ser  
1445 1450 1455

WO 02/08381

PCT/US01/22639

17

Phe Phe Thr Leu Asn Leu Phe Ile Gly Val Ile Ile Asp Asn Phe  
 1460 1465 1470  
 Asn Gln Gln Lys Lys Lys Leu Gly Gly Gln Asp Ile Phe Met Thr  
 1475 1480 1485  
 Glu Glu Gln Lys Lys Tyr Tyr Asn Ala Met Lys Lys Leu Gly Ser  
 1490 1495 1500  
 Lys Lys Pro Gln Lys Pro Ile Pro Arg Pro Leu Asn Lys Tyr Gln  
 1505 1510 1515  
 Gly Phe Ile Phe Asp Ile Val Thr Lys Gln Ala Phe Asp Val Thr  
 1520 1525 1530  
 Ile Met Phe Leu Ile Cys Leu Asn Met Val Thr Met Met Val Glu  
 1535 1540 1545  
 Thr Asp Asp Gln Ser Pro Glu Lys Ile Asn Ile Leu Ala Lys Ile  
 1550 1555 1560  
 Asn Leu Leu Phe Val Ala Ile Phe Thr Gly Glu Cys Ile Val Lys  
 1565 1570 1575  
 Leu Ala Ala Leu Arg His Tyr Tyr Phe Thr Asn Ser Trp Asn Ile  
 1580 1585 1590  
 Phe Asp Phe Val Val Val Ile Leu Ser Ile Val Gly Thr Val Leu  
 1595 1600 1605  
 Ser Asp Ile Ile Gln Lys Tyr Phe Phe Ser Pro Thr Leu Phe Arg  
 1610 1615 1620  
 Val Ile Arg Leu Ala Arg Ile Gly Arg Ile Leu Arg Leu Ile Arg  
 1625 1630 1635  
 Gly Ala Lys Gly Ile Arg Thr Leu Leu Phe Ala Leu Met Met Ser  
 1640 1645 1650  
 Leu Pro Ala Leu Phe Asn Ile Gly Leu Leu Leu Phe Leu Val Met  
 1655 1660 1665  
 Phe Ile Tyr Ser Ile Phe Gly Met Ala Asn Phe Ala Tyr Val Lys  
 1670 1675 1680  
 Trp Glu Ala Gly Ile Asp Asp Met Phe Asn Phe Gln Thr Phe Ala  
 1685 1690 1695

WO 02/08381

PCT/US01/22639

18

Asn Ser Met Leu Cys Leu Phe Gln Ile Thr Thr Ser Ala Gly Trp  
 1700 1705 1710  
 Asp Gly Leu Leu Ser Pro Ile Leu Asn Thr Gly Pro Pro Tyr Cys  
 1715 1720 1725  
 Asp Pro Thr Leu Pro Asn Ser Asn Gly Ser Arg Gly Asp Cys Gly  
 1730 1735 1740  
 Ser Pro Ala Val Gly Ile Leu Phe Phe Thr Thr Tyr Ile Ile Ile  
 1745 1750 1755  
 Ser Phe Leu Ile Val Val Asn Met Tyr Ile Ala Ile Ile Leu Glu  
 1760 1765 1770  
 Asn Phe Ser Val Ala Thr Glu Glu Ser Thr Glu Pro Leu Ser Glu  
 1775 1780 1785  
 Asp Asp Phe Asp Met Phe Tyr Glu Ile Trp Glu Lys Phe Asp Pro  
 1790 1795 1800  
 Glu Ala Thr Gln Phe Ile Glu Tyr Ser Val Leu Ser Asp Phe Ala  
 1805 1810 1815  
 Asp Ala Leu Ser Glu Pro Leu Arg Ile Ala Lys Pro Asn Gln Ile  
 1820 1825 1830  
 Ser Leu Ile Asn Met Asp Leu Pro Met Val Ser Gly Asp Arg Ile  
 1835 1840 1845  
 His Cys Met Asp Ile Leu Phe Ala Phe Thr Lys Arg Val Leu Gly  
 1850 1855 1860  
 Glu Ser Gly Glu Met Asp Ala Leu Lys Ile Gln Met Glu Glu Lys  
 1865 1870 1875  
 Phe Met Ala Ala Asn Pro Ser Lys Ile Ser Tyr Glu Pro Ile Thr  
 1880 1885 1890  
 Thr Thr Leu Arg Arg Lys His Glu Glu Val Ser Ala Met Val Ile  
 1895 1900 1905  
 Gln Arg Ala Phe Arg Arg His Leu Leu Gln Arg Ser Leu Lys His  
 1910 1915 1920  
 Ala Ser Phe Leu Phe Arg Gln Gln Ala Gly Ser Gly Leu Ser Glu  
 1925 1930 1935

WO 02/08381

PCT/US01/22639

19

Glu Asp Ala Pro Glu Arg Glu Gly Leu Ile Ala Tyr Val Met Ser  
1940 1945 1950

Glu Asn Phe Ser Arg Pro Leu Gly Pro Pro Ser Ser Ser Ser Ile  
1955 1960 1965

Ser Ser Thr Ser Phe Pro Pro Ser Tyr Asp Ser Val Thr Arg Ala  
1970 1975 1980

Thr Ser Asp Asn Leu Gln Val Arg Gly Ser Asp Tyr Ser His Ser  
1985 1990 1995

Glu Asp Leu Ala Asp Phe Pro Pro Ser Pro Asp Arg Asp Arg Glu  
2000 2005 2010

Ser Ile Val  
2015

<210> 3  
<211> 8491  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (151)..(6198)

<220>  
<221> Unsure  
<222> (7027)..(8467)  
<223> Each n in this region is a nucleotide for which the base is  
unknown

<400> 3  
gccgctgagc ctgcgcccag tgccccgagc ccgcgcgcga gccaggtccg cgccaagcag 60  
cagccgccca ccccgggggc cggccggggg accagcagct tccccacagg caacgtgagg 120  
agagcctgtg cccagaagca gcatgagaag atg gca aac ttc cta tta cct cgg 174  
Met Ala Asn Phe Leu Leu Pro Arg  
1 5  
ggc acc agc agc ttc cgc agg ttc aca cgg gag tcc ctg gca gcc atc 222  
Gly Thr Ser Ser Phe Arg Arg Phe Thr Arg Glu Ser Leu Ala Ala Ile  
10 15 20  
gag aag cgc atg gcg gag aag caa gcc cgc ggc tca acc acc ttg cag 270  
Glu Lys Arg Met Ala Glu Lys Gln Ala Arg Gly Ser Thr Thr Leu Gln  
25 30 35 40  
gag agc cga gag ggg ctg ccc gag gag gag gct ccc cgg ccc cag ctg 318  
Glu Ser Arg Glu Gly Leu Pro Glu Glu Glu Ala Pro Arg Pro Gln Leu  
45 50 55  
gac ctg cag gcc tcc aaa aag ctg cca gat ctc tat ggc aat cca ccc 366  
Asp Leu Gln Ala Ser Lys Lys Leu Pro Asp Leu Tyr Gly Asn Pro Pro  
60 65 70

WO 02/08381

PCT/US01/22639

20

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| caa gag ctc atc gga gag ccc ctg gag gac ctg gac ccc ttc tat agc<br>Gln Glu Leu Ile Gly Glu Pro Leu Glu Asp Leu Asp Pro Phe Tyr Ser<br>75 80 85        | 414  |
| acc caa aag act ttc atc gta ctg aat aaa ggc aag acc atc ttc cgg<br>Thr Gln Lys Thr Phe Ile Val Leu Asn Lys Gly Lys Thr Ile Phe Arg<br>90 95 100       | 462  |
| ttc agt gcc acc aac gcc ttg tat gtc ctc agt ccc ttc cac cca gtt<br>Phe Ser Ala Thr Asn Ala Leu Tyr Val Leu Ser Pro Phe His Pro Val<br>105 110 115 120 | 510  |
| cgg aga gcg gct gtg aag att ctg gtt cac tgc ctc ttc aac atg ctc<br>Arg Arg Ala Ala Val Lys Ile Leu Val His Ser Leu Phe Asn Met Leu<br>125 130 135     | 558  |
| atc atg tgc acc atc ctc acc aac tgc gtg ttc atg gcc cag cac gac<br>Ile Met Cys Thr Ile Leu Thr Asn Cys Val Phe Met Ala Gln His Asp<br>140 145 150     | 606  |
| cct cca ccc tgg acc aag tat gtc gag tac acc ttc acc gcc att tac<br>Pro Pro Pro Trp Thr Lys Tyr Val Glu Tyr Thr Phe Thr Ala Ile Tyr<br>155 160 165     | 654  |
| acc ttt gag tct ctg gtc aag att ctg gct cga gct ttc tgc ctg cac<br>Thr Phe Glu Ser Leu Val Lys Ile Leu Ala Arg Ala Phe Cys Leu His<br>170 175 180     | 702  |
| gcg ttc act ttc ctt cgg gac cca tgg aac tgg ctg gac ttt agt gtg<br>Ala Phe Thr Phe Leu Arg Asp Pro Trp Asn Trp Leu Asp Phe Ser Val<br>185 190 195 200 | 750  |
| att atc atg gca tac aca act gaa ttt gtg gac ctg ggc aat gtc tca<br>Ile Ile Met Ala Tyr Thr Thr Glu Phe Val Asp Leu Gly Asn Val Ser<br>205 210 215     | 798  |
| gcc tta cgc acc ttc cga gtc ctc cgg gcc ctg aaa act ata tca gtc<br>Ala Leu Arg Thr Phe Arg Val Leu Arg Ala Leu Lys Thr Ile Ser Val<br>220 225 230     | 846  |
| att tca ggg ctg aag acc atc gtg ggg gcc ctg atc cag tct gtg aag<br>Ile Ser Gly Leu Lys Thr Ile Val Gly Ala Leu Ile Gln Ser Val Lys<br>235 240 245     | 894  |
| aag ctg gct gat gtg atg gtc ctc aca gtc ttc tgc ctc agc gtc ttt<br>Lys Leu Ala Asp Val Met Val Leu Thr Val Phe Cys Leu Ser Val Phe<br>250 255 260     | 942  |
| gcc ctc atc ggc ctg cag ctc ttc atg ggc aac cta agg cac aag tgt<br>Ala Leu Ile Gly Leu Gln Leu Phe Met Gly Asn Leu Arg His Lys Cys<br>265 270 275 280 | 990  |
| gtg cgc aac ttc aca gcg ctc aac ggc acc aac ggc tcc gtg gag gcc<br>Val Arg Asn Phe Thr Ala Leu Asn Gly Thr Asn Gly Ser Val Glu Ala<br>285 290 295     | 1038 |
| gac ggc ttg gtc tgg gaa tcc ctg gac ctt tac ctc agt gat cca gaa<br>Asp Gly Leu Val Trp Glu Ser Leu Asp Leu Tyr Leu Ser Asp Pro Glu<br>300 305 310     | 1086 |
| aat tac ctg ctc aag aac ggc acc tct gat gtg tta ctg tgt ggg aac<br>Asn Tyr Leu Leu Lys Asn Gly Thr Ser Asp Val Leu Leu Cys Gly Asn<br>315 320 325     | 1134 |

WO 02/08381

PCT/US01/22639

21

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| agc tct gac gct ggg aca tgt ccg gag ggc tac cgg tgc cta aag gca<br>Ser Ser Asp Ala Gly Thr Cys Pro Glu Gly Tyr Arg Cys Leu Lys Ala<br>330 335 340     | 1182 |
| ggc gag aac ccc gac cac ggc tac acc agc ttc gat tcc ttt gcc tgg<br>Gly Glu Asn Pro Asp His Gly Tyr Thr Ser Phe Asp Ser Phe Ala Trp<br>345 350 355 360 | 1230 |
| gcc ttt ctt gca ctc ttc cgc ctg atg acg cag gac tgc tgg gag cgc<br>Ala Phe Leu Ala Leu Phe Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Trp Glu Arg<br>365 370 375     | 1278 |
| ctc tat cag cag acc ctc agg tcc gca ggg aag atc tac atg atc ttc<br>Leu Tyr Gln Gln Thr Leu Arg Ser Ala Gly Lys Ile Tyr Met Ile Phe<br>380 385 390     | 1326 |
| ttc atg ctt gtc atc ttc ctg ggg tcc ttc tac ctg gtg aac ctg atc<br>Phe Met Leu Val Ile Phe Leu Gly Ser Phe Tyr Leu Val Asn Leu Ile<br>395 400 405     | 1374 |
| ctg gcc gtg gtc gca atg gcc tat gag gag caa aac caa gcc acc atc<br>Leu Ala Val Val Ala Met Ala Tyr Glu Glu Gln Asn Gln Ala Thr Ile<br>410 415 420     | 1422 |
| gct gag acc gag gag aag gaa aag cgc ttc cag gag gcc atg gaa atg<br>Ala Glu Thr Glu Glu Lys Glu Lys Arg Phe Gln Glu Ala Met Glu Met<br>425 430 435 440 | 1470 |
| ctc aag aaa gaa cac gag gcc ctc acc atc agg ggt gtg gat acc gtg<br>Leu Lys Lys Glu His Glu Ala Leu Thr Ile Arg Gly Val Asp Thr Val<br>445 450 455     | 1518 |
| tcc cgt agc tcc ttg gag atg tcc cct ttg gcc cca gta aac agc cat<br>Ser Arg Ser Ser Leu Glu Met Ser Pro Leu Ala Pro Val Asn Ser His<br>460 465 470     | 1566 |
| gag aga aga agc aag agg aga aaa cgg atg tct tca gga act gag gag<br>Glu Arg Arg Ser Lys Arg Arg Lys Arg Met Ser Ser Gly Thr Glu Glu<br>475 480 485     | 1614 |
| tgt ggg gag gac agg ctc ccc aag tct gac tca gaa gat ggt ccc aga<br>Cys Gly Glu Asp Arg Leu Pro Lys Ser Asp Ser Glu Asp Gly Pro Arg<br>490 495 500     | 1662 |
| gca atg aat cat ctc agc ctc acc cgt ggc ctc agc agg act tct atg<br>Ala Met Asn His Leu Ser Leu Thr Arg Gly Leu Ser Arg Thr Ser Met<br>505 510 515 520 | 1710 |
| aag cca cgt tcc agc cgc ggg agc att ttc acc ttt cgc agg cga gac<br>Lys Pro Arg Ser Ser Arg Gly Ser Ile Phe Thr Phe Arg Arg Arg Asp<br>525 530 535     | 1758 |
| ctg ggt tct gaa gca gat ttt gca gat gat gaa aac agc aca ggc cgg<br>Leu Gly Ser Glu Ala Asp Phe Ala Asp Asp Glu Asn Ser Thr Ala Arg<br>540 545 550     | 1806 |
| gag agc gag agc cac cac aca tca ctg ctg gtg ccc tgg ccc ctg cgc<br>Glu Ser Glu Ser His His Thr Ser Leu Leu Val Pro Trp Pro Leu Arg<br>555 560 565     | 1854 |
| cgg acc agt gcc cag gga cag ccc agt ccc gga acc tcg gct cct ggc<br>Arg Thr Ser Ala Gln Gly Gln Pro Ser Pro Gly Thr Ser Ala Pro Gly<br>570 575 580     | 1902 |

WO 02/08381

PCT/US01/22639

22

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| cac gcc ctc cat ggc aaa aag aac agc act gtg gac tgc aat ggg gtg<br>His Ala Leu His Gly Lys Lys Asn Ser Thr Val Asp Cys Asn Gly Val<br>585 590 595 600 | 1950 |
| gtc tca tta ctg ggg gca ggc gac cca gag gcc aca tcc cca gga agc<br>Val Ser Leu Leu Gly Ala Gly Asp Pro Glu Ala Thr Ser Pro Gly Ser<br>605 610 615     | 1998 |
| cac ctc ctc cgc cct gtg atg cta gag cac ccg cca gac acg acc acg<br>His Leu Leu Arg Pro Val Met Leu Glu His Pro Pro Asp Thr Thr Thr<br>620 625 630     | 2046 |
| cca tcg gag gag cca ggc ggc ccc cag atg ctg acc tcc cag gct ccg<br>Pro Ser Glu Glu Pro Gly Gly Pro Gln Met Leu Thr Ser Gln Ala Pro<br>635 640 645     | 2094 |
| tgt gta gat ggc ttc gag gag cca gga gca cgg cag ccg gcc ctc agc<br>Cys Val Asp Gly Phe Glu Glu Pro Gly Ala Arg Gln Arg Ala Leu Ser<br>650 655 660     | 2142 |
| gca gtc agc gtc ctc aca agc gca ctg gaa gag tta gag gag tct cgc<br>Ala Val Ser Val Leu Thr Ser Ala Leu Glu Glu Leu Glu Ser Arg<br>665 670 675 680     | 2190 |
| cac aag tgt cca cca tgc tgg aac cgt ctc gcc cag cgc tac ctg atc<br>His Lys Cys Pro Pro Cys Trp Asn Arg Leu Ala Gln Arg Tyr Leu Ile<br>685 690 695     | 2238 |
| tgg gag tgc tgc ccg ctg tgg atg tcc atc aag cag gga gtg aag ttg<br>Trp Glu Cys Cys Pro Leu Trp Met Ser Ile Lys Gln Gly Val Lys Leu<br>700 705 710     | 2286 |
| gtg gtc atg gac ccg ttt act gac ctc acc atc act atg tgc atc gta<br>Val Val Met Asp Pro Phe Thr Asp Leu Thr Ile Thr Met Cys Ile Val<br>715 720 725     | 2334 |
| ctc aac aca ctc ttc atg ggc ctg gag cac tac aac atg aca agt gaa<br>Leu Asn Thr Leu Phe Met Ala Leu Glu His Tyr Asn Met Thr Ser Glu<br>730 735 740     | 2382 |
| ttc gag gag atg ctg cag gtc gga aac ctg gtc ttc aca ggg att ttc<br>Phe Glu Glu Met Leu Gln Val Gly Asn Leu Val Phe Thr Gly Ile Phe<br>745 750 755 760 | 2430 |
| aca gca gag atg acc ttc aag atc att gcc ctc gac ccc tac tac tac<br>Thr Ala Glu Met Thr Phe Lys Ile Ile Ala Leu Asp Pro Tyr Tyr Tyr<br>765 770 775     | 2478 |
| ttc caa cag ggc tgg aac atc ttc gac agc atc atc gtc atc ctt agc<br>Phe Gln Gln Gly Trp Asn Ile Phe Asp Ser Ile Ile Val Ile Leu Ser<br>780 785 790     | 2526 |
| ctc atg gag ctg ggc ctg tcc cgc atg agc aac ttg tcg gtg ctg cgc<br>Leu Met Glu Leu Gly Leu Ser Arg Met Ser Asn Leu Ser Val Leu Arg<br>795 800 805     | 2574 |
| tcc ttc cgc ctg ctg cgg gtc ttc aag ctg gcc aaa tca tgg ccc acc<br>Ser Phe Arg Leu Leu Arg Val Phe Lys Leu Ala Lys Ser Trp Pro Thr<br>810 815 820     | 2622 |
| ctg aac aca ctc atc aag atc atc ggg aac tca gtg ggg gca ctg ggg<br>Leu Asn Thr Leu Ile Lys Ile Ile Gly Asn Ser Val Gly Ala Leu Gly<br>825 830 835 840 | 2670 |

WO 02/08381

PCT/US01/22639

23

|                                                                                                                                                        |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| aac ctg aca ctg gtg cta gcc atc atc gtg ttc atc ttt gct gtg gtg<br>Asn Leu Thr Leu Val Leu Ala Ile Ile Val Phe Ile Phe Ala Val Val<br>845 850 855      | 2718 |
| ggc atg cag ctc ttt ggc aag aac tac tcg gag ctg agg gac agc gac<br>Gly Met Gln Leu Phe Gly Lys Asn Tyr Ser Glu Leu Arg Asp Ser Asp<br>860 865 870      | 2766 |
| tca ggc ctg ctg cct cgc tgg cao atg atg gac ttc ttt cat gcc ttc<br>Ser Gly Leu Leu Pro Arg Trp His Met Met Asp Phe Phe His Ala Phe<br>875 880 885      | 2814 |
| cta atc atc ttc cgc atc ctc tgt gga gag tgg atc gag acc atg tgg<br>Leu Ile Ile Phe Arg Ile Leu Cys Gly Glu Trp Ile Glu Thr Met Trp<br>890 895 900      | 2862 |
| gac tgc atg gag gtg tcg ggg cag tca tta tgc ctg ctg gtc ttc ttg<br>Asp Cys Met Glu Val Ser Gly Gln Ser Leu Cys Leu Leu Val Phe Leu<br>905 910 915 920  | 2910 |
| ctt gtt atg gtc att ggc aac ctt gtg gtc ctg aat ctc ttc ctg gcc<br>Leu Val Met Val Ile Gly Asn Leu Val Val Leu Asn Leu Phe Leu Ala<br>925 930 935      | 2958 |
| ttg ctg ctc agc tcc ttc agt gca gac aac ctc aca gcc cct gat gag<br>Leu Leu Leu Ser Ser Phe Ser Ala Asp Asn Leu Thr Ala Pro Asp Glu<br>940 945 950      | 3006 |
| gac aga gag atg aac aac ctc cag ctg gcc ctg gcc cgc atc cag agg<br>Asp Arg Glu Met Asn Asn Leu Gln Leu Ala Leu Ala Arg Ile Gln Arg<br>955 960 965      | 3054 |
| ggc ctg cgc ttt gtc aag cgg acc acc tgg gat ttc tgc tgt ggt ctc<br>Gly Leu Arg Phe Val Lys Arg Thr Thr Trp Asp Phe Cys Cys Gly Leu<br>970 975 980      | 3102 |
| ctg cgg cac cgg cct cag aag ccc gca gcc ctt gcc gcc cag ggc cag<br>Leu Arg His Arg Pro Gln Lys Pro Ala Ala Leu Ala Ala Gln Gly Gln<br>985 990 995 1000 | 3150 |
| ctg ccc agc tgc att gcc acc ccc tac tcc ccg cca ccc cca gag<br>Leu Pro Ser Cys Ile Ala Thr Pro Tyr Ser Pro Pro Pro Pro Glu<br>1005 1010 1015           | 3195 |
| acg gag aag gtg cct ccc acc cgc aag gaa aca cag ttt gag gaa<br>Thr Glu Lys Val Pro Pro Thr Arg Lys Glu Thr Gln Phe Glu Glu<br>1020 1025 1030           | 3240 |
| ggc gag caa cca ggc cag ggc acc ccc ggg gat cca gag ccc gtg<br>Gly Glu Gln Pro Gly Gln Gly Thr Pro Gly Asp Pro Glu Pro Val<br>1035 1040 1045           | 3285 |
| tgt gtg ccc atc gct gtg gcc gag tca gac aca gat gac caa gaa<br>Cys Val Pro Ile Ala Val Ala Glu Ser Asp Thr Asp Asp Gln Glu<br>1050 1055 1060           | 3330 |
| gag gat gag gag aac agc ctg ggc acg gag gag gag tcc agc aag<br>Glu Asp Glu Glu Asn Ser Leu Gly Thr Glu Glu Glu Ser Ser Lys<br>1065 1070 1075           | 3375 |
| cag cag gaa tcc cag cct gtg tcc ggc tgg ccc aga ggc cct ccg<br>Gln Gln Glu Ser Gln Pro Val Ser Gly Trp Pro Arg Gly Pro Pro<br>1080 1085 1090           | 3420 |

WO 02/08381

PCT/US01/22639

24

|                                        |                                        |                                        |      |
|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|------|
| gat tcc agg acc tgg<br>Asp Ser Arg Thr | agc cag gtg tca gcg<br>Ser Gln Val Ser | act gcc tac tct gag<br>Thr Ala Tyr Ser | 3465 |
| 1095                                   | 1100                                   | 1105                                   |      |
| gcc gag gcc agt gca<br>Ala Glu Ala Ser | tct cag gcc gac tgg<br>Ser Gln Ala Asp | cgg cag cag tgg aaa<br>Arg Gln Gln Trp | 3510 |
| 1110                                   | 1115                                   | 1120                                   |      |
| gcg gaa ccc cag gcc<br>Ala Glu Pro Gln | cca ggg tgc ggt gag<br>Pro Gly Cys Gly | acc cca gag gac agt<br>Thr Pro Glu Asp | 3555 |
| 1125                                   | 1130                                   | 1135                                   |      |
| tgc tcc gag ggc agc<br>Cys Ser Glu Gly | aca gca gac atg acc<br>Thr Ala Asp Met | aac acc gct gag ctc<br>Asn Thr Ala Glu | 3600 |
| 1140                                   | 1145                                   | 1150                                   |      |
| ctg gag cag atc cct<br>Leu Glu Gln Ile | gac ctc ggc cag gat<br>Asp Leu Gly Gln | gtc aag gac cca gag<br>Val Lys Asp Pro | 3645 |
| 1155                                   | 1160                                   | 1165                                   |      |
| gac tgc ttc act gaa<br>Asp Cys Phe Thr | ggc tgt gtc cgg cgc<br>Gly Cys Val Arg | tgt ccc tgc tgt cgc<br>Cys Pro Cys Cys | 3690 |
| 1170                                   | 1175                                   | 1180                                   |      |
| gtg gac acc aca cag<br>Val Asp Thr Thr | gcc cca ggg aag gtc<br>Ala Pro Gly Lys | tgg tgg cgg ttg cgc<br>Trp Trp Arg Leu | 3735 |
| 1185                                   | 1190                                   | 1195                                   |      |
| aag acc tgc tac cac<br>Lys Thr Cys Tyr | atc gtg gag cac agc<br>Ile Val Glu His | tgg ttc gag aca ttc<br>Trp Phe Glu Thr | 3780 |
| 1200                                   | 1205                                   | 1210                                   |      |
| atc atc ttc atg atc<br>Ile Ile Phe Met | cta ctc agc agt gga<br>Leu Leu Ser Ser | gcg ctg gcc ttc gag<br>Ala Leu Ala Phe | 3825 |
| 1215                                   | 1220                                   | 1225                                   |      |
| gac atc tac cta gag<br>Asp Ile Tyr Leu | gag cgg aag acc atc<br>Glu Arg Lys Thr | aag gtt ctg ctt gag<br>Lys Val Leu Leu | 3870 |
| 1230                                   | 1235                                   | 1240                                   |      |
| tat gcc gac aag atg<br>Tyr Ala Asp Lys | ttc aca tat gtc ttc<br>Phe Thr Tyr Val | gtg ctg gag atg ctg<br>Val Leu Glu Met | 3915 |
| 1245                                   | 1250                                   | 1255                                   |      |
| ctc aag tgg gtg gcc<br>Leu Lys Trp Val | tac gcc ttc aag aag<br>Tyr Gly Phe Lys | tac ttc acc aat gcc<br>Tyr Phe Thr Asn | 3960 |
| 1260                                   | 1265                                   | 1270                                   |      |
| tgg tgc tgg ctc gac<br>Trp Cys Trp Leu | ttc ctc atc gta gac<br>Phe Leu Ile Val | gtc tct ctg gtc agc<br>Val Ser Leu Val | 4005 |
| 1275                                   | 1280                                   | 1285                                   |      |
| ctg gtg gcc aac acc<br>Leu Val Ala Asn | ctg ggc ttt gcc gag<br>Leu Gly Phe Ala | atg ggc ccc atc aag<br>Met Gly Pro Ile | 4050 |
| 1290                                   | 1295                                   | 1300                                   |      |
| tca ctg cgg acg ctg<br>Ser Leu Arg Thr | cgt gca ctc cgt cct<br>Arg Ala Leu Arg | ctg aga gct ctg tca<br>Leu Arg Ala Leu | 4095 |
| 1305                                   | 1310                                   | 1315                                   |      |
| cga ttt gag ggc atg<br>Arg Phe Glu Gly | agg gtg gtg gtc aat<br>Arg Val Val Val | gcc ctg gtg ggc gcc<br>Ala Leu Val Gly | 4140 |
| 1320                                   | 1325                                   | 1330                                   |      |

WO 02/08381

PCT/US01/22639

25

|                                                    |                                                    |                                                    |      |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------|
| atc cgg tcc atc atg<br>Ile Pro Ser Ile Met<br>1335 | aac gtc ctc ctc gtc<br>Asn Val Leu Leu Val<br>1340 | tgc ctc atc ttc tgg<br>Cys Leu Ile Phe Trp<br>1345 | 4185 |
| ctc atc ttc agc atc<br>Leu Ile Phe Ser Ile<br>1350 | atg ggc gtg aac ctc<br>Met Gly Val Asn Leu<br>1355 | ttt gcg ggg aag ttt<br>Phe Ala Gly Lys Phe<br>1360 | 4230 |
| ggg agg tgc atc aac<br>Gly Arg Cys Ile Asn<br>1365 | cag aca gag gga gac<br>Gln Thr Glu Gly Asp<br>1370 | ttg cct ttg aac tac<br>Leu Pro Leu Asn Tyr<br>1375 | 4275 |
| acc atc gtg aac aac<br>Thr Ile Val Asn Asn<br>1380 | aag agc cag tgt gag<br>Lys Ser Gln Cys Glu<br>1385 | tcc ttg aac ttg acc<br>Ser Leu Asn Leu Thr<br>1390 | 4320 |
| gga gaa ttg tac tgg<br>Gly Glu Leu Tyr Trp<br>1395 | acc aag gtg aaa gtc<br>Thr Lys Val Lys Val<br>1400 | aac ttt gac aac gtg<br>Asn Phe Asp Asn Val<br>1405 | 4365 |
| ggg gcc ggg tac ctg<br>Gly Ala Gly Tyr Leu<br>1410 | gcc ctt ctg cag gtg<br>Ala Leu Leu Gln Val<br>1415 | gca aca ttt aaa ggc<br>Ala Thr Phe Lys Gly<br>1420 | 4410 |
| tgg atg gac att atg<br>Trp Met Asp Ile Met<br>1425 | tat gca gct gtg gac<br>Tyr Ala Ala Val Asp<br>1430 | tcc agg ggg tat gaa<br>Ser Arg Gly Tyr Glu<br>1435 | 4455 |
| gag cag cct cag tgg<br>Glu Gln Pro Gln Trp<br>1440 | gaa tac aac ctc tac<br>Glu Tyr Asn Leu Tyr<br>1445 | atg tac atc tat ttt<br>Met Tyr Ile Tyr Phe<br>1450 | 4500 |
| gtc att ttc atc atc<br>Val Ile Phe Ile Ile<br>1455 | ttt ggg tct ttc ttc<br>Phe Gly Ser Phe Phe<br>1460 | acc ctg aac ctc ttt<br>Thr Leu Asn Leu Phe<br>1465 | 4545 |
| att ggt gtc atc att<br>Ile Gly Val Ile Ile<br>1470 | gac aac ttc aac caa<br>Asp Asn Phe Asn Gln<br>1475 | cag aag aaa aag tta<br>Gln Lys Lys Lys Leu<br>1480 | 4590 |
| ggg ggc cag gac atc<br>Gly Gly Gln Asp Ile<br>1485 | ttc atg aca gag gag<br>Phe Met Thr Glu Glu<br>1490 | cag aag aag tac tac<br>Gln Lys Lys Tyr Tyr<br>1495 | 4635 |
| aat gcc atg aag aag<br>Asn Ala Met Lys Lys<br>1500 | ctg ggc tcc aag aag<br>Leu Gly Ser Lys Lys<br>1505 | ccc cag aag ccc atc<br>Pro Gln Lys Pro Ile<br>1510 | 4680 |
| cca cgg ccc ctg aac<br>Pro Arg Pro Leu Asn<br>1515 | aag tac cag ggc ttc<br>Lys Tyr Gln Gly Phe<br>1520 | ata ttc gac att gtg<br>Ile Phe Asp Ile Val<br>1525 | 4725 |
| acc aag cag gcc ttt<br>Thr Lys Gln Ala Phe<br>1530 | gac gtc acc atc atg<br>Asp Val Thr Ile Met<br>1535 | ttt ctg atc tgc ttg<br>Phe Leu Ile Cys Leu<br>1540 | 4770 |
| aat atg gtg acc atg<br>Asn Met Val Thr Met<br>1545 | atg gtg gag aca gat<br>Met Val Glu Thr Asp<br>1550 | gac caa agt cct gag<br>Asp Gln Ser Pro Glu<br>1555 | 4815 |
| aaa atc aac atc ttg<br>Lys Ile Asn Ile Leu<br>1560 | gcc aag atc aac ctg<br>Ala Lys Ile Asn Leu<br>1565 | ctc ttt gtg gcc atc<br>Leu Phe Val Ala Ile<br>1570 | 4860 |

WO 02/08381

PCT/US01/22639

26

|                                                    |                                                    |                                                    |      |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------|
| ttc aca ggc gag tgt<br>Phe Thr Gly Glu Cys<br>1575 | att gtc aag ctg gct<br>Ile Val Lys Leu Ala<br>1580 | gcc ctg cgc cac tac<br>Ala Leu Arg His Tyr<br>1585 | 4905 |
| tac ttc acc aac agc<br>Tyr Phe Thr Asn Ser<br>1590 | tgg aat atc ttc gac<br>Trp Asn Ile Phe Asp<br>1595 | ttc gtg gtt gtc atc<br>Phe Val Val Val Ile<br>1600 | 4950 |
| ctc tcc atc gtg ggc<br>Leu Ser Ile Val Gly<br>1605 | act gtg ctc tcg gac<br>Thr Val Leu Ser Asp<br>1610 | atc atc cag aag tac<br>Ile Ile Gln Lys Tyr<br>1615 | 4995 |
| ttc ttc tcc ccg acg<br>Phe Phe Ser Pro Thr<br>1620 | ctc ttc cga gtc atc<br>Leu Phe Arg Val Ile<br>1625 | cgc ctg gcc cga ata<br>Arg Leu Ala Arg Ile<br>1630 | 5040 |
| ggc cgc atc ctc aga<br>Gly Arg Ile Leu Arg<br>1635 | ctg atc cga ggg gcc<br>Leu Ile Arg Gly Ala<br>1640 | aag ggg atc cgc acg<br>Lys Gly Ile Arg Thr<br>1645 | 5085 |
| ctg ctc ttt gcc ctc<br>Leu Leu Phe Ala Leu<br>1650 | atg atg tcc ctg cct<br>Met Met Ser Leu Pro<br>1655 | gcc ctc ttc aac atc<br>Ala Leu Phe Asn Ile<br>1660 | 5130 |
| ggg ctg ctg ctc ttc<br>Gly Leu Leu Leu Phe<br>1665 | ctc gtc atg ttc atc<br>Leu Val Met Phe Ile<br>1670 | tac tcc atc ttt ggc<br>Tyr Ser Ile Phe Gly<br>1675 | 5175 |
| atg gcc aac ttc gct<br>Met Ala Asn Phe Ala<br>1680 | tat gtc aag tgg gag<br>Tyr Val Lys Trp Glu<br>1685 | gct ggc atc gac gac<br>Ala Gly Ile Asp Asp<br>1690 | 5220 |
| atg ttc aac ttc cag<br>Met Phe Asn Phe Gln<br>1695 | acc ttc gcc aac ago<br>Thr Phe Ala Asn Ser<br>1700 | atg ctg tgc ctc ttc<br>Met Leu Cys Leu Phe<br>1705 | 5265 |
| cag atc acc acg tcg<br>Gln Ile Thr Thr Ser<br>1710 | gcc ggc tgg gat ggc<br>Ala Gly Trp Asp Gly<br>1715 | ctc ctc agc ccc atc<br>Leu Leu Ser Pro Ile<br>1720 | 5310 |
| ctc aac act ggg ccg<br>Leu Asn Thr Gly Pro<br>1725 | ccc tac tgc gac ccc<br>Pro Tyr Cys Asp Pro<br>1730 | act ctg ccc aac agc<br>Thr Leu Pro Asn Ser<br>1735 | 5355 |
| aat ggc tct cgg ggg<br>Asn Gly Ser Arg Gly<br>1740 | gac tgc ggg agc cca<br>Asp Cys Gly Ser Pro<br>1745 | gcc gtg ggc atc ctc<br>Ala Val Gly Ile Leu<br>1750 | 5400 |
| ttc ttc acc acc tac<br>Phe Phe Thr Thr Tyr<br>1755 | atc atc atc tcc ttc<br>Ile Ile Ile Ser Phe<br>1760 | ctc atc gtg gtc aac<br>Leu Ile Val Val Asn<br>1765 | 5445 |
| atg tac att gcc atc<br>Met Tyr Ile Ala Ile<br>1770 | atc ctg gag aac ttc<br>Ile Leu Glu Asn Phe<br>1775 | agc gtg gcc acg gag<br>Ser Val Ala Thr Glu<br>1780 | 5490 |
| gag agc acc gag ccc<br>Glu Ser Thr Glu Pro<br>1785 | ctg agt gag gac gac<br>Leu Ser Glu Asp Asp<br>1790 | ttc gat atg ttc tat<br>Phe Asp Met Phe Tyr<br>1795 | 5535 |
| gag atc tgg gag aaa<br>Glu Ile Trp Glu Lys<br>1800 | ttt gac cca gag gcc<br>Phe Asp Pro Glu Ala<br>1805 | act cag ttt att gag<br>Thr Gln Phe Ile Glu<br>1810 | 5580 |

WO 02/08381

PCT/US01/22639

27

|                                                                    |                                                    |                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------|
| tat tog gtc ctg tct<br>Tyr Ser Val Leu Ser<br>1815                 | gac ttt gcc gac gcc<br>Asp Phe Ala Asp Ala<br>1820 | ctg tct gag cca ctc<br>Leu Ser Glu Pro Leu<br>1825 | 5625 |
| cgt atc gcc aag ccc<br>Arg Ile Ala Lys Pro<br>1830                 | aac cag ata agc ctc<br>Asn Gln Ile Ser Leu<br>1835 | atc aac atg gac ctg<br>Ile Asn Met Asp Leu<br>1840 | 5670 |
| ccc atg gtg agt ggg<br>Pro Met Val Ser Gly<br>1845                 | gac cgc atc cat tgc<br>Asp Arg Ile His Cys<br>1850 | atg gac att ctc ttt<br>Met Asp Ile Leu Phe<br>1855 | 5715 |
| gcc ttc acc aaa agg<br>Ala Phe Thr Lys Arg<br>1860                 | gtc ctg ggg gag tct<br>Val Leu Gly Glu Ser<br>1865 | ggg gag atg gac gcc<br>Gly Glu Met Asp Ala<br>1870 | 5760 |
| ctg aag atc cag atg<br>Leu Lys Ile Gln Met<br>1875                 | gag gag aag ttc atg<br>Glu Glu Lys Phe Met<br>1880 | gca gcc aac cca tcc<br>Ala Ala Asn Pro Ser<br>1885 | 5805 |
| aag atc tcc tac gag<br>Lys Ile Ser Tyr Glu<br>1890                 | ccc atc acc acc aca<br>Pro Ile Thr Thr Thr<br>1895 | ctc cgg cgc aag cac<br>Leu Arg Arg Lys His<br>1900 | 5850 |
| gaa gag gtg tog gcc<br>Glu Glu Val Ser Ala<br>1905                 | atg gtt atc cag aga<br>Met Val Ile Gln Arg<br>1910 | gcc ttc cgc agg cac<br>Ala Phe Arg Arg His<br>1915 | 5895 |
| ctg ctg caa cgc tct<br>Leu Leu Gln Arg Ser<br>1920                 | ttg aag cat gcc tcc<br>Leu Lys His Ala Ser<br>1925 | ttc ctc ttc cgt cag<br>Phe Leu Phe Arg Gln<br>1930 | 5940 |
| cag gcg ggc agc gcc<br>Gln Ala Gly Ser Gly<br>1935                 | ctc tcc gaa gag gat<br>Leu Ser Glu Glu Asp<br>1940 | gcc cct gag cga gag<br>Ala Pro Glu Arg Glu<br>1945 | 5985 |
| ggc ctc atc gcc tac<br>Gly Leu Ile Ala Tyr<br>1950                 | gtg atg agt gag aac<br>Val Met Ser Glu Asn<br>1955 | ttc tcc cga ccc ctt<br>Phe Ser Arg Pro Leu<br>1960 | 6030 |
| ggc cca ccc tcc agc<br>Gly Pro Pro Ser Ser<br>1965                 | tcc tcc atc tcc tcc<br>Ser Ser Ile Ser Ser<br>1970 | act tcc ttc cca ccc<br>Thr Ser Phe Pro Pro<br>1975 | 6075 |
| tcc tat gac agt gtc<br>Ser Tyr Asp Ser Val<br>1980                 | act aga gcc acc agc<br>Thr Arg Ala Thr Ser<br>1985 | gat aac ctc cag gtg<br>Asp Asn Leu Gln Val<br>1990 | 6120 |
| cgg ggg tct gac tac<br>Arg Gly Ser Asp Tyr<br>1995                 | agc cac agt gaa gat<br>Ser His Ser Glu Asp<br>2000 | ctc gcc gac ttc ccc<br>Leu Ala Asp Phe Pro<br>2005 | 6165 |
| cct tct ccg gac agg<br>Pro Ser Pro Asp Arg<br>2010                 | gac cgt gag tcc atc<br>Asp Arg Glu Ser Ile<br>2015 | gtg tgagcctcgg<br>Val                              | 6208 |
| ctgggctggc caggacacac tgaaaagcag cctttttcac catggcaaac ctaaatgcag  |                                                    |                                                    | 6268 |
| tcagtcacaa accagcctgg ggccttcctg gctttgggag taagaaatgg gctcggcccc  |                                                    |                                                    | 6328 |
| cgcggatcaa ccaggcagag ttctgtggcg ccgcgtggac agccggagca gttggcctgt  |                                                    |                                                    | 6388 |
| gcttgagggc ctcagataga cctgtgacct ggtctgggtca ggcaatgccc ctgcggctct |                                                    |                                                    | 6448 |

WO 02/08381

PCT/US01/22639

28

```

ggaaagcaac ttcatcccag ctgctgaggc gaaatataaa actgagactg tatatgttgt 6508
gaatgggctt tcataaattt attatatttg atattttttt acttgagcaa agaactaagg 6568
atthttccat ggacatgggc agcaattcac gctgtctctt cttaaccttg aacaagagtg 6628
tctatggagc agccgggaagt ctgttctcaa agcagaagtg gaatccagtg tggctccac 6688
aggtcttcaac tgcccagggg tgaatgggg tccccctccc acttgacctg agatgctggg 6748
agggctgaac cccactcac acaagcacac acacacacag tctcacaca cggaggccag 6808
acacaggccg tgggacccag gctcccagcc taaggagagc aggcctttcc ctgcccggcc 6868
cccaaggatg gggttcttgt ccacggggct cactctggcc cctattgtc tcccaaggtc 6928
ccattttccc ccttggtgtt tcacgcaggt catattgtca gtctacaaa aataaaaggc 6988
ttccagagga gagggtgctg gggctccagg gctgggcent aggcactgat agttgcttt 7048
tcttcccctc ctgtaagagt attaacaaaa ccaagagaca caagggtgca agccccctc 7108
acggcctggc atgcagcttg tctttgctcc tggaaacctg caggccctgc cagccagcca 7168
atggaagaga ggggctgagc catgggggtt tggggctaag aagttcacca gccctgagcc 7228
atggsnscce tcagctgccc tgaagagagg aaactggcga tctccagggt cctctotggc 7288
catacncgga ggagtttton ngtgtggtct ccagctctcc tccagacaca gagacatggg 7348
agtggggaga ggaagtgtgc cctggccctg tgcagggaag gggatggta gggccagttc 7408
tcgtgccctc tagaggggaa tgaacctagg cacccttgag agagggggca ctgtggtcag 7468
gccagccctc tctggcnng tccggggatc ctgatggcac ccacacagag gacctctttg 7528
gggcaagatc caggtggncc ccataggtct tgtgaaaagg ctttttcagg gaaaaatatt 7588
ttactagtc aatcaccccc aggcactctt cagctgctga caatcctatt tagcatatgc 7648
aaatctttta acatagagaa ctgtcacctc gaggtacacg ggtcaactgg cgaagagcag 7708
gccagggggc ttggctgnnc cattccagct ctncacnga nnnctccwm ncnnnnncat 7768
nnctcccagg ccacctcagt ctcanctgcc ggctctgggc tggctnctcc taacctacct 7828
nnccagctg tgggagggct ggacatttgt ggcagtgtgt aanggggcat tgsnggcgag 7888
taaagtatta kgtttcttct tgtcacccca gttcccttg tggcaacccc agaccaaccc 7948
catgcccctg acagatctag ttctcttctc ctgtgttccc ttgagtcen gtgtgggaca 8008
cggtttaact gtcccagcga gatttctcca agtngaata ctatttttgt agatctccat 8068
gctttgnctc tcaaggcttg gagaggtag tgcccctcct nggbnctcac cgcctgctac 8128
acaggcagga atgcggnttg ggaggcaggt cgggctcena gccagctgg ccggaaggag 8188
actgtggttt ttgtgtgtgt ggacagcncg ggagctttga gacagntgc ctggggctgg 8248
ctgcagacgg tgtggttggg ggtgggaggt gagctagacc nnncccttag cttttagcct 8308
ggctgtcacc tttttaattt ccagaactgc acaatgacca gnaggagggg agaagagagt 8368

```

WO 02/08381

PCT/US01/22639

29

aggaaaaagg aggggaaggac agacatcaag tgccagatgt tgtctgaact aatcgagcac 8428  
ttotcaccaa acttcnngta taaataaaat acatannnng gggcaaacca ataatggct 8488  
tac 8491

<210> 4  
<211> 2016  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met Ala Asn Phe Leu Leu Pro Arg Gly Thr Ser Ser Phe Arg Arg Phe  
1 5 10 15  
Thr Arg Glu Ser Leu Ala Ala Ile Glu Lys Arg Met Ala Glu Lys Gln  
20 25 30  
Ala Arg Gly Ser Thr Thr Leu Gln Glu Ser Arg Glu Gly Leu Pro Glu  
35 40 45  
Glu Glu Ala Pro Arg Pro Gln Leu Asp Leu Gln Ala Ser Lys Lys Leu  
50 55 60  
Pro Asp Leu Tyr Gly Asn Pro Pro Gln Glu Leu Ile Gly Glu Pro Leu  
65 70 75 80  
Glu Asp Leu Asp Pro Phe Tyr Ser Thr Gln Lys Thr Phe Ile Val Leu  
85 90 95  
Asn Lys Gly Lys Thr Ile Phe Arg Phe Ser Ala Thr Asn Ala Leu Tyr  
100 105 110  
Val Leu Ser Pro Phe His Pro Val Arg Arg Ala Ala Val Lys Ile Leu  
115 120 125  
Val His Ser Leu Phe Asn Met Leu Ile Met Cys Thr Ile Leu Thr Asn  
130 135 140  
Cys Val Phe Met Ala Gln His Asp Pro Pro Pro Trp Thr Lys Tyr Val  
145 150 155 160  
Glu Tyr Thr Phe Thr Ala Ile Tyr Thr Phe Glu Ser Leu Val Lys Ile  
165 170 175  
Leu Ala Arg Ala Phe Cys Leu His Ala Phe Thr Phe Leu Arg Asp Pro  
180 185 190

WO 02/08381

PCT/US01/22639

30

Trp Asn Trp Leu Asp Phe Ser Val Ile Ile Met Ala Tyr Thr Thr Glu  
 195 200 205  
 Phe Val Asp Leu Gly Asn Val Ser Ala Leu Arg Thr Phe Arg Val Leu  
 210 215 220  
 Arg Ala Leu Lys Thr Ile Ser Val Ile Ser Gly Leu Lys Thr Ile Val  
 225 230 235 240  
 Gly Ala Leu Ile Gln Ser Val Lys Lys Leu Ala Asp Val Met Val Leu  
 245 250 255  
 Thr Val Phe Cys Leu Ser Val Phe Ala Leu Ile Gly Leu Gln Leu Phe  
 260 265 270  
 Met Gly Asn Leu Arg His Lys Cys Val Arg Asn Phe Thr Ala Leu Asn  
 275 280 285  
 Gly Thr Asn Gly Ser Val Glu Ala Asp Gly Leu Val Trp Glu Ser Leu  
 290 295 300  
 Asp Leu Tyr Leu Ser Asp Pro Glu Asn Tyr Leu Leu Lys Asn Gly Thr  
 305 310 315 320  
 Ser Asp Val Leu Leu Cys Gly Asn Ser Ser Asp Ala Gly Thr Cys Pro  
 325 330 335  
 Glu Gly Tyr Arg Cys Leu Lys Ala Gly Glu Asn Pro Asp His Gly Tyr  
 340 345 350  
 Thr Ser Phe Asp Ser Phe Ala Trp Ala Phe Leu Ala Leu Phe Arg Leu  
 355 360 365  
 Met Thr Gln Asp Cys Trp Glu Arg Leu Tyr Gln Gln Thr Leu Arg Ser  
 370 375 380  
 Ala Gly Lys Ile Tyr Met Ile Phe Phe Met Leu Val Ile Phe Leu Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Tyr Leu Val Asn Leu Ile Leu Ala Val Val Ala Met Ala Tyr  
 405 410 415  
 Glu Glu Gln Asn Gln Ala Thr Ile Ala Glu Thr Glu Glu Lys Glu Lys  
 420 425 430  
 Arg Phe Gln Glu Ala Met Glu Met Leu Lys Lys Glu His Glu Ala Leu  
 435 440 445

WO 02/08381

PCT/US01/22639

31

Thr Ile Arg Gly Val Asp Thr Val Ser Arg Ser Ser Leu Glu Met Ser  
450 455 460

Pro Leu Ala Pro Val Asn Ser His Glu Arg Arg Ser Lys Arg Arg Lys  
465 470 475 480

Arg Met Ser Ser Gly Thr Glu Glu Cys Gly Glu Asp Arg Leu Pro Lys  
485 490 495

Ser Asp Ser Glu Asp Gly Pro Arg Ala Met Asn His Leu Ser Leu Thr  
500 505 510

Arg Gly Leu Ser Arg Thr Ser Met Lys Pro Arg Ser Ser Arg Gly Ser  
515 520 525

Ile Phe Thr Phe Arg Arg Arg Asp Leu Gly Ser Glu Ala Asp Phe Ala  
530 535 540

Asp Asp Glu Asn Ser Thr Ala Arg Glu Ser Glu Ser His His Thr Ser  
545 550 555 560

Leu Leu Val Pro Trp Pro Leu Arg Arg Thr Ser Ala Gln Gly Gln Pro  
565 570 575

Ser Pro Gly Thr Ser Ala Pro Gly His Ala Leu His Gly Lys Lys Asn  
580 585 590

Ser Thr Val Asp Cys Asn Gly Val Val Ser Leu Leu Gly Ala Gly Asp  
595 600 605

Pro Glu Ala Thr Ser Pro Gly Ser His Leu Leu Arg Pro Val Met Leu  
610 615 620

Glu His Pro Pro Asp Thr Thr Thr Pro Ser Glu Glu Pro Gly Gly Pro  
625 630 635 640

Gln Met Leu Thr Ser Gln Ala Pro Cys Val Asp Gly Phe Glu Glu Pro  
645 650 655

Gly Ala Arg Gln Arg Ala Leu Ser Ala Val Ser Val Leu Thr Ser Ala  
660 665 670

Leu Glu Glu Leu Glu Glu Ser Arg His Lys Cys Pro Pro Cys Trp Asn  
675 680 685

Arg Leu Ala Gln Arg Tyr Leu Ile Trp Glu Cys Cys Pro Leu Trp Met  
690 695 700

WO 02/08381

PCT/US01/22639

32

Ser Ile Lys Gln Gly Val Lys Leu Val Val Met Asp Pro Phe Thr Asp  
705 710 715 720

Leu Thr Ile Thr Met Cys Ile Val Leu Asn Thr Leu Phe Met Ala Leu  
725 730 735

Glu His Tyr Asn Met Thr Ser Glu Phe Glu Glu Met Leu Gln Val Gly  
740 745 750

Asn Leu Val Phe Thr Gly Ile Phe Thr Ala Glu Met Thr Phe Lys Ile  
755 760 765

Ile Ala Leu Asp Pro Tyr Tyr Tyr Phe Gln Gln Gly Trp Asn Ile Phe  
770 775 780

Asp Ser Ile Ile Val Ile Leu Ser Leu Met Glu Leu Gly Leu Ser Arg  
785 790 795 800

Met Ser Asn Leu Ser Val Leu Arg Ser Phe Arg Leu Leu Arg Val Phe  
805 810 815

Lys Leu Ala Lys Ser Trp Pro Thr Leu Asn Thr Leu Ile Lys Ile Ile  
820 825 830

Gly Asn Ser Val Gly Ala Leu Gly Asn Leu Thr Leu Val Leu Ala Ile  
835 840 845

Ile Val Phe Ile Phe Ala Val Val Gly Met Gln Leu Phe Gly Lys Asn  
850 855 860

Tyr Ser Glu Leu Arg Asp Ser Asp Ser Gly Leu Leu Pro Arg Trp His  
865 870 875 880

Met Met Asp Phe Phe His Ala Phe Leu Ile Ile Phe Arg Ile Leu Cys  
885 890 895

Gly Glu Trp Ile Glu Thr Met Trp Asp Cys Met Glu Val Ser Gly Gln  
900 905 910

Ser Leu Cys Leu Leu Val Phe Leu Leu Val Met Val Ile Gly Asn Leu  
915 920 925

Val Val Leu Asn Leu Phe Leu Ala Leu Leu Leu Ser Ser Phe Ser Ala  
930 935 940

Asp Asn Leu Thr Ala Pro Asp Glu Asp Arg Glu Met Asn Asn Leu Gln  
945 950 955 960

WO 02/08381

PCT/US01/22639

33

Leu Ala Leu Ala Arg Ile Gln Arg Gly Leu Arg Phe Val Lys Arg Thr  
 965 970 975  
 Thr Trp Asp Phe Cys Cys Gly Leu Leu Arg His Arg Pro Gln Lys Pro  
 980 985 990  
 Ala Ala Leu Ala Ala Gln Gly Gln Leu Pro Ser Cys Ile Ala Thr Pro  
 995 1000 1005  
 Tyr Ser Pro Pro Pro Pro Glu Thr Glu Lys Val Pro Pro Thr Arg  
 1010 1015 1020  
 Lys Glu Thr Gln Phe Glu Glu Gly Glu Gln Pro Gly Gln Gly Thr  
 1025 1030 1035  
 Pro Gly Asp Pro Glu Pro Val Cys Val Pro Ile Ala Val Ala Glu  
 1040 1045 1050  
 Ser Asp Thr Asp Asp Gln Glu Glu Asp Glu Glu Asn Ser Leu Gly  
 1055 1060 1065  
 Thr Glu Glu Glu Ser Ser Lys Gln Gln Glu Ser Gln Pro Val Ser  
 1070 1075 1080  
 Gly Trp Pro Arg Gly Pro Pro Asp Ser Arg Thr Trp Ser Gln Val  
 1085 1090 1095  
 Ser Ala Thr Ala Tyr Ser Glu Ala Glu Ala Ser Ala Ser Gln Ala  
 1100 1105 1110  
 Asp Trp Arg Gln Gln Trp Lys Ala Glu Pro Gln Ala Pro Gly Cys  
 1115 1120 1125  
 Gly Glu Thr Pro Glu Asp Ser Cys Ser Glu Gly Ser Thr Ala Asp  
 1130 1135 1140  
 Met Thr Asn Thr Ala Glu Leu Leu Glu Gln Ile Pro Asp Leu Gly  
 1145 1150 1155  
 Gln Asp Val Lys Asp Pro Glu Asp Cys Phe Thr Glu Gly Cys Val  
 1160 1165 1170  
 Arg Arg Cys Pro Cys Cys Ala Val Asp Thr Thr Gln Ala Pro Gly  
 1175 1180 1185  
 Lys Val Trp Trp Arg Leu Arg Lys Thr Cys Tyr His Ile Val Glu  
 1190 1195 1200

WO 02/08381

PCT/US01/22639

34

His Ser Trp Phe Glu Thr Phe Ile Ile Phe Met Ile Leu Leu Ser  
 1205 1210 1215  
 Ser Gly Ala Leu Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Leu Glu Glu Arg Lys  
 1220 1225 1230  
 Thr Ile Lys Val Leu Leu Glu Tyr Ala Asp Lys Met Phe Thr Tyr  
 1235 1240 1245  
 Val Phe Val Leu Glu Met Leu Leu Lys Trp Val Ala Tyr Gly Phe  
 1250 1255 1260  
 Lys Lys Tyr Phe Thr Asn Ala Trp Cys Trp Leu Asp Phe Leu Ile  
 1265 1270 1275  
 Val Asp Val Ser Leu Val Ser Leu Val Ala Asn Thr Leu Gly Phe  
 1280 1285 1290  
 Ala Glu Met Gly Pro Ile Lys Ser Leu Arg Thr Leu Arg Ala Leu  
 1295 1300 1305  
 Arg Pro Leu Arg Ala Leu Ser Arg Phe Glu Gly Met Arg Val Val  
 1310 1315 1320  
 Val Asn Ala Leu Val Gly Ala Ile Pro Ser Ile Met Asn Val Leu  
 1325 1330 1335  
 Leu Val Cys Leu Ile Phe Trp Leu Ile Phe Ser Ile Met Gly Val  
 1340 1345 1350  
 Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Gly Arg Cys Ile Asn Gln Thr Glu  
 1355 1360 1365  
 Gly Asp Leu Pro Leu Asn Tyr Thr Ile Val Asn Asn Lys Ser Gln  
 1370 1375 1380  
 Cys Glu Ser Leu Asn Leu Thr Gly Glu Leu Tyr Trp Thr Lys Val  
 1385 1390 1395  
 Lys Val Asn Phe Asp Asn Val Gly Ala Gly Tyr Leu Ala Leu Leu  
 1400 1405 1410  
 Gln Val Ala Thr Phe Lys Gly Trp Met Asp Ile Met Tyr Ala Ala  
 1415 1420 1425  
 Val Asp Ser Arg Gly Tyr Glu Glu Gln Pro Gln Trp Glu Tyr Asn  
 1430 1435 1440

WO 02/08381

PCT/US01/22639

35

Leu Tyr Met Tyr Ile Tyr Phe Val Ile Phe Ile Ile Phe Gly Ser  
 1445 1450 1455  
 Phe Phe Thr Leu Asn Leu Phe Ile Gly Val Ile Ile Asp Asn Phe  
 1460 1465 1470  
 Asn Gln Gln Lys Lys Lys Leu Gly Gly Gln Asp Ile Phe Met Thr  
 1475 1480 1485  
 Glu Glu Gln Lys Lys Tyr Tyr Asn Ala Met Lys Lys Leu Gly Ser  
 1490 1495 1500  
 Lys Lys Pro Gln Lys Pro Ile Pro Arg Pro Leu Asn Lys Tyr Gln  
 1505 1510 1515  
 Gly Phe Ile Phe Asp Ile Val Thr Lys Gln Ala Phe Asp Val Thr  
 1520 1525 1530  
 Ile Met Phe Leu Ile Cys Leu Asn Met Val Thr Met Met Val Glu  
 1535 1540 1545  
 Thr Asp Asp Gln Ser Pro Glu Lys Ile Asn Ile Leu Ala Lys Ile  
 1550 1555 1560  
 Asn Leu Leu Phe Val Ala Ile Phe Thr Gly Glu Cys Ile Val Lys  
 1565 1570 1575  
 Leu Ala Ala Leu Arg His Tyr Tyr Phe Thr Asn Ser Trp Asn Ile  
 1580 1585 1590  
 Phe Asp Phe Val Val Val Ile Leu Ser Ile Val Gly Thr Val Leu  
 1595 1600 1605  
 Ser Asp Ile Ile Gln Lys Tyr Phe Phe Ser Pro Thr Leu Phe Arg  
 1610 1615 1620  
 Val Ile Arg Leu Ala Arg Ile Gly Arg Ile Leu Arg Leu Ile Arg  
 1625 1630 1635  
 Gly Ala Lys Gly Ile Arg Thr Leu Leu Phe Ala Leu Met Met Ser  
 1640 1645 1650  
 Leu Pro Ala Leu Phe Asn Ile Gly Leu Leu Leu Phe Leu Val Met  
 1655 1660 1665  
 Phe Ile Tyr Ser Ile Phe Gly Met Ala Asn Phe Ala Tyr Val Lys  
 1670 1675 1680

WO 02/08381

PCT/US01/22639

36

Trp Glu Ala Gly Ile Asp Asp Met Phe Asn Phe Gln Thr Phe Ala  
 1685 1690 1695  
 Asn Ser Met Leu Cys Leu Phe Gln Ile Thr Thr Ser Ala Gly Trp  
 1700 1705 1710  
 Asp Gly Leu Leu Ser Pro Ile Leu Asn Thr Gly Pro Pro Tyr Cys  
 1715 1720 1725  
 Asp Pro Thr Leu Pro Asn Ser Asn Gly Ser Arg Gly Asp Cys Gly  
 1730 1735 1740  
 Ser Pro Ala Val Gly Ile Leu Phe Phe Thr Thr Tyr Ile Ile Ile  
 1745 1750 1755  
 Ser Phe Leu Ile Val Val Asn Met Tyr Ile Ala Ile Ile Leu Glu  
 1760 1765 1770  
 Asn Phe Ser Val Ala Thr Glu Glu Ser Thr Glu Pro Leu Ser Glu  
 1775 1780 1785  
 Asp Asp Phe Asp Met Phe Tyr Glu Ile Trp Glu Lys Phe Asp Pro  
 1790 1795 1800  
 Glu Ala Thr Gln Phe Ile Glu Tyr Ser Val Leu Ser Asp Phe Ala  
 1805 1810 1815  
 Asp Ala Leu Ser Glu Pro Leu Arg Ile Ala Lys Pro Asn Gln Ile  
 1820 1825 1830  
 Ser Leu Ile Asn Met Asp Leu Pro Met Val Ser Gly Asp Arg Ile  
 1835 1840 1845  
 His Cys Met Asp Ile Leu Phe Ala Phe Thr Lys Arg Val Leu Gly  
 1850 1855 1860  
 Glu Ser Gly Glu Met Asp Ala Leu Lys Ile Gln Met Glu Glu Lys  
 1865 1870 1875  
 Phe Met Ala Ala Asn Pro Ser Lys Ile Ser Tyr Glu Pro Ile Thr  
 1880 1885 1890  
 Thr Thr Leu Arg Arg Lys His Glu Glu Val Ser Ala Met Val Ile  
 1895 1900 1905  
 Gln Arg Ala Phe Arg Arg His Leu Leu Gln Arg Ser Leu Lys His  
 1910 1915 1920

WO 02/08381

PCT/US01/22639

37

Ala Ser Phe Leu Phe Arg Gln Gln Ala Gly Ser Gly Leu Ser Glu  
 1925 1930 1935

Glu Asp Ala Pro Glu Arg Glu Gly Leu Ile Ala Tyr Val Met Ser  
 1940 1945 1950

Glu Asn Phe Ser Arg Pro Leu Gly Pro Pro Ser Ser Ser Ser Ile  
 1955 1960 1965

Ser Ser Thr Ser Phe Pro Pro Ser Tyr Asp Ser Val Thr Arg Ala  
 1970 1975 1980

Thr Ser Asp Asn Leu Gln Val Arg Gly Ser Asp Tyr Ser His Ser  
 1985 1990 1995

Glu Asp Leu Ala Asp Phe Pro Pro Ser Pro Asp Arg Asp Arg Glu  
 2000 2005 2010

Ser Ile Val  
 2015

<210> 5  
 <211> 63  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Theoretical nucleic acid to demonstrate percent homology.

<400> 5  
 accgtagcta cgtacgtata tagaaagggc gcgatcgicg tcgctatga cgacttagca 60  
 tgc 63

<210> 6  
 <211> 130  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Theoretical sequence to demonstrate percent homology.

<400> 6  
 accgtagct acgtacgtta tttagaaagg ggtgtgtgtg tgtgtgtaaa cgggggtttt 60  
 cgggtagct cgtcgcgtat gacgacttag ccatgcacgg tatatcgtat taggactagc 120  
 gattgactag 130

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/008381 A3**

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68, C07K 14/47, 16/18, C12N 15/85, 5/10, A01K 67/027, G01N 33/50
- (21) International Application Number: PCT/US01/22639
- (22) International Filing Date: 19 July 2001 (19.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/219,738 20 July 2000 (20.07.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION (US/US); 615 Arapuen Drive, Suite 110, Salt Lake City, UT 84108 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): KEATING, Mark, T. (US/US); 1 Mason Street, Brookline, MA 02446 (US). SPLAWSKI, Igor (PL/US); 36 Queensberry Street, Apt. 7, Boston, MA 02215 (US).
- (74) Agents: SAXE, Stephen, A. et al.; Rothwell, Figg, Ernst & Manbeck, P.C., Suite 800, 1425 K Street, N.W., Washington, D.C. 20005 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 7 August 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/008381 A3

(54) Title: COMMON POLYMORPHISM IN SCN5A IMPLICATED IN DRUG-INDUCED CARDIAC ARRHYTHMIA

(57) Abstract: The present invention is directed to a specific mutation in SCN5A which causes drug-induced torsade de pointes or ventricular fibrillation. Persons with the mutation are predisposed to developing drug-induced torsade de pointes or ventricular fibrillation when administered certain drugs. This predisposition can be diagnosed in accordance with the present invention by analyzing the DNA sequence of the SCN5A of an individual. By screening patients for the mutation, drug-induced torsade de pointes or ventricular fibrillation can be avoided. Furthermore, drugs can be tested to determine whether they will cause torsade de pointes or ventricular fibrillation.

## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | International Application No.<br>PCT/US 01/22639                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 7 C12Q1/68 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/85 C12N5/10<br>A01K67/027 G01N33/50                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 7 C12Q C07K C12N A01K G01N                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                  |
| Category *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No.                                            |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | ROOK M B ET AL.: "Human SCN5A gene mutations alter cardiac sodium channel kinetics and are associated with the Brugada syndrome"<br>CARDIOVASCULAR RESEARCH, vol. 44, 1999, pages 507-517, XP002227968 cited in the application<br>* see especially page 508, col.2 - page 509, col.1; as well as Fig.'s 3,4 *<br>the whole document<br>---<br>-/-- | 1-8,19, 21-25, 27,28                                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                  |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"M" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                  |
| Date of the actual completion of the international search<br>21 January 2003                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Date of mailing of the international search report<br>06/02/2003 |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.O. Box 5616 Patentlaan 2<br>NL - 2200 LV Maastricht<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax (+31-70) 340-2016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Authorized officer<br>Knehr, M                                   |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Int. Appl. No.<br>PCT/US 01/22639 |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                   |
| Category *                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Relevant to claim No.             |
| Y                                                    | GELLENS M E ET AL: "PRIMARY STRUCTURE AND FUNCTIONAL EXPRESSION OF THE HUMAN CARDIAC TETRODOTOXIN-INSENSITIVE VOLTAGE-DEPENDENT SODIUM CHANNEL"<br>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US,<br>vol. 89, January 1992 (1992-01), pages 554-558, XP002925329<br>ISSN: 0027-8424<br>cited in the application<br>the whole document | 1-8,19,<br>21-25,<br>27,28        |
| A                                                    | WO 96 28537 A (UNIV UTAH RES FOUND)<br>19 September 1996 (1996-09-19)<br><br>abstract; examples 12-14                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 9-13,<br>15-17,<br>19-28          |
| A                                                    | DESCHEMES I ET AL.: "Electrophysiological characterization of SCN5A mutations causing long QT (E1784K) and Brugada (R1512W and R1432G) syndromes"<br>CARDIOVASCULAR RESEARCH,<br>vol. 46, 2000, pages 55-65, XP002227969<br>cited in the application<br>the whole document                                                                                                                  | 2-7,19,<br>21-25,<br>27,28        |
| A                                                    | CHEN Q ET AL.: "Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation"<br>NATURE,<br>vol. 392, - 19 March 1998 (1998-03-19)<br>pages 293-296, XP001121995<br>abstract<br>page 293, column 1, paragraph 2 -page 294, column 1, paragraph 5                                                                                                                           | 6,7,19,<br>21-25,28               |
| A                                                    | WANG Q ET AL: "SCN5A MUTATIONS ASSOCIATED WITH AN INHERITED CARDIAC ARRHYTHMIA, LONG QT SYNDROME"<br>CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US,<br>vol. 80, no. 10,<br>10 February 1995 (1995-02-10), pages 805-811, XP000919018<br>ISSN: 0092-8674<br>the whole document                                                                                                                         |                                   |
| A                                                    | DUMAINE R ET AL.: "Ionic mechanism responsible for the electrocardiographic phenotype of the Brugada syndrome are temperature dependent"<br>CIRCULATION RESEARCH,<br>vol. 85, 1999, pages 803-809, XP002227970<br>the whole document                                                                                                                                                        |                                   |
|                                                      | -/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                   |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                          |                                                                                                                                                                                                                     | Pat. No. Application No.<br>PCT/US 01/22639 |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                     |                                             |
| Category *                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                  | Relevant to claim No.                       |
| T                                                    | SPLAWSKI I ET AL.: "Variant of SCN5A sodium channel implicated in risk of cardiac arrhythmia"<br>SCIENCE,<br>vol. 297, - 23 August 2002 (2002-08-23)<br>pages 1333-1336, XP002227971<br>the whole document<br>----- | 19-28                                       |

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | national application No.<br>PCT/US 01/22639 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                             |
| This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                             |
| 1. <input checked="" type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                       | Claims Nos.:<br>because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:<br>Although claims 6, 7, and 10-14 are directed to diagnostic methods practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the polymorphism as specified within SEQ ID NO:4. |                                             |
| 2. <input checked="" type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                       | Claims Nos.: 29-31<br>because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:<br>see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210                                                             |                                             |
| 3. <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                  | Claims Nos.:<br>because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).                                                                                                                                                                                                      |                                             |
| <b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                             |
| This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                             |
| 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                             |
| 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                             |
| 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                             |
| 4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                             |
| Remark on Protest                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                             |
| <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                             |
| <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                             |

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

International Application No. PCT/US 01/22639

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 29-31

Present claim 2 relates to a nucleic acid probe defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that it hybridizes specifically to a mutant SCN5A DNA encoding SEQ ID NO:4 AND NOT to the corresponding wild-type DNA. The claim therefore covers all possible probes having this characteristic or property, whereas the application provides no support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for any of such probes. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define such probes by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely allele-specific probes being able to make such a distinction between SEQ ID NO:3 and the corresponding wild-type, thus hybridizing with the SCN5A gene at the position of the specified polymorphism AND comprising the latter.

The same refers to claims 3-5 referring to a method for diagnosing such a polymorphism by using such a probe. The search has therefore limited to methods using probes comprising the specified polymorphism.

Likewise, claim 9 relates to an antibody defined by a result to be achieved, namely its property to bind to a polypeptide according to SEQ ID NO:4 AND NOT to the corresponding wild-type amino acid sequence. Without disclosure or support of any specific region or epitope suggesting specificity in binding as a presupposition for such a distinction, again there is no support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for any of such antibodies.

The same refers to claims 10-13 referring to a method for diagnosing predisposition of drug-induced torsade de pointes or ventricular fibrillation by using such an antibody. The search of claims 9-13 has therefore been limited to antibodies and methods using them within the context of the S1103C polymorphism of the SCN5A protein.

Present claims 19-28 relate to methods of screening for drugs or for determining a patient's risk of getting torsade de pointes or ventricular fibrillation, based on addition of such drugs and measuring resultant Na<sup>+</sup> currents. However, these claims refer to an extremely large number of possible drugs within the methods as claimed. In fact, the claims contain so many options referring to the nature of such a drug, that a lack of clarity and/or conciseness within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search over the whole scope of the claims impossible, based on lack of any example of such a drug or any data giving support in how such a drug might influence the measured Na<sup>+</sup> currents, or could be used to evaluate a patient's risk for torsade de pointes or ventricular fibrillation. Consequently, the search has been

International Application No. PCT/US 01 22639

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

limited to those claims, not yet referring to the addition of said drugs (parts a)-f) of claims 19-24, and parts a)-c) of claims 25-28). Likewise, claims 29-31 refer to such drugs. In addition, claim 29 relates to a method for screening drugs relying on a transgenic animal not supported nor disclosed by the application. In the present case, this claim so lacks support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. For similar reasons as above, claims 30 and 31 lack support and disclosure. Consequently, no search has been carried out for claims 29-31.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No.  
PCT/US 01/22639

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) |            | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---|---------------------|----------------------------|------------|---------------------|
| WO 9628537                                | A | 19-09-1996          | US                         | 5599673 A  | 04-02-1997          |
|                                           |   |                     | CA                         | 2214646 A1 | 19-09-1996          |
|                                           |   |                     | EP                         | 0815197 A1 | 07-01-1998          |
|                                           |   |                     | WO                         | 9628537 A1 | 19-09-1996          |
| <hr/>                                     |   |                     |                            |            |                     |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1999)

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | F I            | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------|------------|
| C 1 2 N 1/19             | C 1 2 N 1/19   | 4 B 0 6 5  |
| C 1 2 N 1/21             | C 1 2 N 1/21   | 4 H 0 4 5  |
| C 1 2 N 5/10             | C 1 2 P 21/08  |            |
| C 1 2 P 21/08            | C 1 2 Q 1/02   |            |
| C 1 2 Q 1/02             | C 1 2 Q 1/68   | A          |
| C 1 2 Q 1/68             | G 0 1 N 27/00  | Z          |
| G 0 1 N 27/00            | G 0 1 N 33/15  | Z          |
| G 0 1 N 27/447           | G 0 1 N 33/50  | Z          |
| G 0 1 N 33/15            | G 0 1 N 33/53  | D          |
| G 0 1 N 33/50            | G 0 1 N 33/53  | M          |
| G 0 1 N 33/53            | G 0 1 N 33/566 |            |
| G 0 1 N 33/566           | C 1 2 N 5/00   | A          |
|                          | G 0 1 N 27/26  | 3 1 5 E    |

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 マーク・ティ・キーティング

アメリカ合衆国 0 2 4 4 6 マサチューセッツ州ブルックライン、メイソン・ストリート 1 番

(72)発明者 イゴール・スプラフスキー

アメリカ合衆国 0 2 2 1 5 マサチューセッツ州ボストン、アパートメント 7、クイーンズベリー・ストリート 3 6 番

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA29 AA40 BA11 BA14 BB03 BB20 BB24 CA25 CA26  
CB01 CB07 CB11 CB17 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37  
DA77 FB02 FB03 FB05 GC20  
2G060 AA07 AC10 AE17 AF20 FA01 HA02 HC07 HC10 HC18 HD03  
KA06  
4B024 AA11 BA41 BA80 CA03 CA09 CA11 DA02 EA04 GA11 HA12  
HA15 HA20  
4B063 QA01 QA12 QA13 QA19 QQ13 QQ20 QQ42 QQ68 QQ79 QR14  
QR32 QR35 QR41 QR55 QR62 QR80 QS25 QS34 QS38 QX04  
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13  
4B065 AA19X AA26X AA41X AA90X AA91X AA93X AB01 AB05 AC14 BA02  
BA08 CA24 CA25 CA44 CA46  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA50 FA72 FA73  
FA74