

(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2004-535178

(P2004-535178A)

(43) 公表日 平成16年11月25日(2004.11.25)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/711	A 6 1 K 31/711	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 78 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-587594 (P2002-587594)	(71) 出願人	502386053
(86) (22) 出願日	平成14年5月9日 (2002.5.9)		バイオノミックス リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月7日 (2003.11.7)		オーストラリア, サウス オーストラリ
(86) 国際出願番号	PCT/AU2002/000581		ア 5 0 3 1, セバルトン, ダルグレ
(87) 国際公開番号	W02002/090532		イッシュ ストリート 3 1
(87) 国際公開日	平成14年11月14日 (2002.11.14)	(74) 代理人	100103816
(31) 優先権主張番号	PR 4922		弁理士 風早 信昭
(32) 優先日	平成13年5月10日 (2001.5.10)	(74) 代理人	100120927
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		弁理士 浅野 典子
		(72) 発明者	マレイ, ジョン, チャールズ
			オーストラリア, サウス オーストラリ
			ア 5 0 4 6, フィルレ, ダンクレイ
			アベニュー 1 3
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 新規変異

(57) 【要約】

電位依存性ナトリウムチャンネルの哺乳動物の変異型 β -1 サブユニットをコードする単離された核酸分子であって、変異事象が生じており、前記変異事象は、組み立てられたナトリウムチャンネルの機能発現を、てんかんの表現型が生じるように妨げているが、ただし、前記変異事象は、コードされるポリペプチドにおける C 1 2 1 W 置換をもたらす変異事象ではない単離された核酸分子。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

電位依存性ナトリウムチャンネルの哺乳動物の変異型 $\beta-1$ サブユニットをコードする単離された核酸分子であって、変異事象が生じており、前記変異事象は、組み立てられたナトリウムチャンネルの機能発現を、てんかんの表現型が生じるように妨げているが、ただし、前記変異事象は、コードされるポリペプチドにおける C 1 2 1 W 置換をもたらす変異事象ではない単離された核酸分子。

【請求項 2】

前記変異事象は、コードされるポリペプチドのアミノ末端ドメインの細胞外ループにおいてシステイン残基の導入をもたらす請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

10

【請求項 3】

前記変異事象は、第 3 エキソンに生じる請求項 2 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 4】

前記変異事象は、コード配列の 2 5 3 位において生じる請求項 3 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 5】

前記変異事象は、C から T へのヌクレオチド置換である請求項 4 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 6】

配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

20

【請求項 7】

配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列からなる単離された核酸分子。

【請求項 8】

電位依存性ナトリウムチャンネルの哺乳動物の変異型 $\beta-1$ サブユニットである単離された哺乳動物ポリペプチドであって、変異事象が生じており、前記変異事象は、組み立てられたナトリウムチャンネルの機能発現を、てんかんの表現型が生じるように妨げているが、ただし、前記変異事象は C 1 2 1 W 置換ではない単離されたポリペプチド。

【請求項 9】

前記変異事象は、ポリペプチドのアミノ末端ドメインの細胞外ループにシステイン残基を導入する請求項 8 に記載の単離されたポリペプチド。

30

【請求項 10】

前記変異事象は、8 5 位において生じる請求項 8 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 11】

前記変異事象は、R 8 5 C 置換である請求項 10 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 12】

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド

【請求項 13】

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる単離されたポリペプチド。

【請求項 14】

哺乳動物の組み立てられた電位依存性ナトリウムチャンネルである単離されたポリペプチド複合体であって、変異事象が $\beta-1$ サブユニットに生じており、前記変異事象は、組み立てられたナトリウムチャンネルの機能発現を、てんかんの表現型が生じるように妨げているが、ただし、前記変異事象は、C 1 2 1 W 置換ではない単離されたポリペプチド複合体。

40

【請求項 15】

前記変異事象は、 $\beta-1$ サブユニットのアミノ末端ドメインの細胞外ループにシステイン残基を導入する請求項 14 に記載の単離されたポリペプチド複合体。

【請求項 16】

前記変異事象は、 $\beta-1$ サブユニットの 8 5 位において生じる請求項 15 に記載の単離されたポリペプチド複合体。

50

【請求項 17】

前記変異事象は、R85C置換である請求項16に記載の単離されたポリペプチド複合体。

【請求項 18】

請求項1～7のいずれか一項に記載の単離された核酸分子で形質転換された細胞。

【請求項 19】

請求項8～11のいずれか一項に規定される変異型 β -1サブユニットを組み込んでいる哺乳動物のナトリウムチャンネルを含む細胞。

【請求項 20】

下記の工程を含むポリペプチドを調製する方法：

(1) 請求項18または19に記載の細胞を、ポリペプチドを産生させるために効果的な条件のもとで培養する工程；および

(2) ポリペプチドを集める工程。

【請求項 21】

請求項20に記載の方法により調製されるポリペプチド。

【請求項 22】

請求項8～13のいずれか一項に記載の単離されたポリペプチド、請求項21に記載のポリペプチド、または請求項14～17のいずれか一項に記載の単離されたポリペプチド複合体との免疫学的反応性を有する抗体。

【請求項 23】

モノクローナル抗体、ヒト化された抗体、キメラ抗体またはFabフラグメント、(Fab')₂フラグメント、Fvフラグメントを含む抗体フラグメント、単鎖抗体およびシングルドメイン抗体からなる群から選択される請求項22に記載の抗体。

【請求項 24】

てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を処置する方法であって、ナトリウムチャンネルが、請求項8～11または14～17のいずれか一項に規定される変異事象を受けたとき、ナトリウムチャンネルの選択的なアゴニスト、アンタゴニストまたは調節剤をそのような処置を必要とする被験体に投与することを含む方法。

【請求項 25】

ナトリウムチャンネルの選択的なアゴニスト、アンタゴニストまたは調節剤の使用であって、ナトリウムチャンネルが、請求項8～11または14～17のいずれか一項に規定される変異事象を受けたとき、てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を処置するための医薬品を製造することにおけるそのような使用。

【請求項 26】

てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を処置する方法であって、請求項22または23に記載の抗体を、そのような処置を必要とする被験体に投与することを含む方法。

【請求項 27】

てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を処置する方法であって、請求項1～7のいずれか一項に規定される核酸分子の相補体（アンチセンス）であり、変異型ナトリウムチャンネル β -1サブユニットをコードするmRNAとハイブリダイゼーションするRNA分子をコードする単離されたDNA分子を、そのような処置を必要とする被験体に投与することを含む方法。

【請求項 28】

請求項1～7のいずれか一項に規定される核酸分子の相補体であり、変異型ナトリウムチャンネル β -1サブユニットをコードするmRNAとハイブリダイゼーションするRNA分子をコードするDNA分子の使用であって、てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を処置するための医薬品を製造することにおけるそのような使用。

【請求項 29】

10

20

30

40

50

てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を処置する方法であって、請求項 22 または 23 に記載の抗体、または請求項 1～7 のいずれか一項に規定される核酸分子の相補体であり、変異型ナトリウムチャンネル $\beta-1$ サブユニットをコードする mRNA とハイブリダイゼーションする RNA 分子をコードする DNA 分子を、そのような処置を必要とする被験体に、野生型 SCN1B の投与との組合せで投与することを含む方法。

【請求項 30】

請求項 22 または 23 に記載の抗体、または請求項 1～7 のいずれか一項に規定される核酸分子の相補体であり、変異型ナトリウムチャンネル $\beta-1$ サブユニットをコードする mRNA とハイブリダイゼーションする RNA 分子をコードする DNA 分子の使用であって、てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を処置するための医薬品を製造することにおいて、野生型 SCN1B の使用と組み合わせたそのような使用。

【請求項 31】

候補の薬学的薬剤をスクリーニングするための、請求項 8～13 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは請求項 14～17 のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体の使用。

【請求項 32】

高処理能スクリーニング技術が用いられる請求項 31 に記載の使用。

【請求項 33】

てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害の処置に有用であるナトリウムチャンネルの活性の調節剤をスクリーニングする方法であって、下記の工程：

- a) 請求項 18 または 19 に記載の細胞を提供する工程；
- b) 前記細胞を試験化合物に接触させる工程；
- c) 前記試験化合物が、コードされるタンパク質に結合するかどうか、または前記試験化合物が、コードされるタンパク質を組み込んでいるナトリウムチャンネルの生物学的活性を調節するかどうかを検出する工程；

を含む方法であって、

タンパク質に結合する、またはコードされるタンパク質を組み込んでいるナトリウムチャンネルの生物学的活性を調節する試験化合物が、障害を処置するために有用な化合物である方法。

【請求項 34】

てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害の処置に有用であるナトリウムチャンネルの活性の調節剤をスクリーニングする方法であって、下記の工程：

- a) 請求項 8～13 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは請求項 14～17 のいずれか一項に記載のポリペプチド複合体を提供する工程；
- b) 前記ポリペプチドまたはポリペプチド複合体を試験化合物に接触させる工程；
- c) 前記試験化合物が、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体に結合するかどうかを検出する工程；

を含む方法であって、

ポリペプチドまたはポリペプチド複合体に結合する試験化合物が、障害を処置するために有用な化合物である方法。

【請求項 35】

請求項 33 または 34 に記載の方法によって同定される化合物。

【請求項 36】

請求項 35 に記載の化合物および薬学的に受容可能なキャリアを含有する薬学的組成物。

【請求項 37】

請求項 1～7 のいずれか一項に規定される単離された核酸分子で形質転換された遺伝子改

変の非ヒト動物。

【請求項 38】

動物は、ラット、マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ならびにサルおよびチンパンジーなどのヒト以外の霊長類からなる群から選択される請求項 37 に記載の遺伝子改変の非ヒト動物。

【請求項 39】

候補の薬学的化合物のスクリーニングにおける請求項 37 または 38 に記載の遺伝子改変の非ヒト動物の使用。

【請求項 40】

請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の核酸分子を含有する発現ベクター。

10

【請求項 41】

てんかん、特に、熱性発作プラスである全身性てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害の診断における請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の核酸分子の使用。

【請求項 42】

てんかん、特に、熱性発作プラスである全身性てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害の診断における請求項 8 ～ 17 のいずれか一項に規定されるポリペプチドの使用。

【請求項 43】

てんかん、特に、熱性発作プラスである全身性てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害の診断における請求項 22 または 23 に規定される抗体の使用。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、てんかんに関与する SCN1B 遺伝子における新しい変異に関し、より詳細には、熱性発作プラスである全身性てんかん（GEFS+）と関連する新しい SCN1B 遺伝子変異に関する。

【0002】

背景技術

てんかんは、集団の約 3 % がその生涯のあるときに冒される脳障害の多様な集まりである（Anners、1996）。てんかん性発作は、中枢神経系のニューロン集団の損なわれた神経刺激伝達によって引き起こされる一次的な行動変化として定義することができる。これにより、様々な程度の不随意筋の収縮が生じ、多くの場合には意識がなくなる。てんかん症候群は、特徴的な症状、発作のタイプ、原因、発症年齢および EEG パターンに基づいて 40 を越える異なるタイプに分類されている（国際抗てんかん連盟の分類および用語に関する委員会、1989 年）。しかし、すべての症候群に共通する唯一の特徴は、発作として偶発的および予測不能的にその両方で現れるニューロン興奮性の持続した増大である。

30

【0003】

てんかんの病因に対する遺伝的寄与が約 40 % の罹患者には存在すると見積もられている（Gardiner、2000）。てんかん性発作は、ニューロンの同期性を最終的には乱す多数の分子的異常の終点であると考えられるので、てんかんに対する遺伝的基礎は一樣でない可能性が高い。200 を越えるメンデル疾患が存在しており、これには、てんかんが表現型の一部として含まれる。これらの疾患において、発作は、脳の構造または脳機能における乱れなどの根本的な神経学的関与を示している。これに対して、てんかんが罹患者における唯一の症状発現である「純粋な」てんかん症候群もまた数多く存在する。これらは特発性と呼ばれ、てんかん症例全体の 60 % 以上を占める。

40

【0004】

特発性てんかんは部分性および全身性のサブタイプにさらに分けられる。部分性（焦点性

50

または局所性) のてんかん発作は限局化した皮質放電から生じており、その結果、特定の筋肉群のみが関与し、意識が保持されている場合がある (Sutton、1990)。しかし、全身性てんかんでは、EEG放電は、脳の皮質下領域全体が関与するように焦点を全く示さない。全身性てんかんが頻繁に遺伝するという観察は理解できるが、脳において構成的に発現しているとおそらくは考えられる遺伝子欠陥が部分性の発作を生じさせる機構はあまり明瞭ではない。

【0005】

特発性の全身性てんかん (IGE) は、遺伝型ヒトてんかんの最も一般的な群である。現在、IGEの2つの幅広い群が知られている：すなわち、古典的な特発性全身性てんかん (国際抗てんかん連盟の分類および用語に関する委員会、1989年) および熱性発作プラスである全身性てんかん (GEFS⁺) の新しく認識された遺伝的症候群 (Scheffer および Berkovic、1997; Singh 他、1999)。古典的IGEは、臨床的に認識可能であるが、重複する数多くの重症候群に分けられ、これには、小児期欠神てんかん (CAE)、若年性欠神てんかん、若年ミオクロニー性てんかんなどが含まれる (国際抗てんかん連盟の分類および用語に関する委員会、1989年; Roger 他、1992)。これらの重症候群は、発症年齢および発作タイプのパターン (欠神、ミオクロヌスおよび強直間代性) によって特定される。一部の患者、特に、強直間代性発作だけを有する患者は、特異的に認識される重症候群に合わない。神経生物学的に連続する一部であるとは未だに認識されていないが、これらを個々の症候群と見なすことに関する議論が以前に示されている (Berkovic 他、1987; 1994; Reutens および Berkovic、1995)。

【0006】

熱性発作プラスである全身性てんかん (GEFS⁺; MIN604236) は、1997年に初めて報告された (Scheffer & Berkovic、1997) が、現在では一般的なてんかん症候群として認識されている (Singh 他、1999; Baulac 他、1999; Peiffer 他、1999; Scheffer 他、2000)。GEFS⁺は家族性であるが、それぞれの家系内において臨床的に一様でないために、GEFS⁺を別の症候群として認識することは、最初、困難であった。共通する表現型は典型的な熱性発作および熱性発作プラス (FS⁺) であり、この場合、FS⁺は、発熱を伴う発作が6年以上継続し、かつ/または非熱性の強直間代性発作を含む点で、典型的な熱性発作とは異なる。あまり一般的でない表現型には、欠神またはミオクロニー性発作または脱力発作を伴うFS⁺、そして、ミオクロニー性失立発作てんかんなどのさらにより重篤な症候群が含まれる。そのような表現型多様性が単一遺伝子における変異の分離と関連し得ることが、電位依存性ナトリウムチャンネル β -1サブユニット遺伝子 (SCN1B) における変異の同定とともに明らかにされた (Wallace 他、1998)。この変異 (C121W) は、保存されているシステイン残基を変化させ、推定されるジスルフィド架橋を破壊して、SCN1Bサブユニットの機能をインビトロで喪失させる。機能的なSCN1Bサブユニットが存在しない場合、ナトリウムチャンネル α サブユニットの不活性化速度が低下し、これは、増大したナトリウム流入を生じさせることがあるが、より脱分極化した膜電位および過興奮性をもたらす。

【0007】

さらなる研究において、GEFS⁺の4つの家系が染色体2qにマッピングされた (Baulac 他、1999; Moulard 他、1999; Peiffer 他、1999; Lope s-Cendes 他、2000)。近年には、染色体2qにマッピングされるニューロンの電位依存性ナトリウムチャンネル α -1 (SCN1A) サブユニットにおける様々な変異がGEFS⁺の家系において報告された (Wallace 他、2001)。その変異 (D188V、V1353L および I1656M) はすべてが、サブユニットの膜貫通セグメントの近くまたはその内部に位置する非常に保存された残基の中に存在する。SCN1Aにおける変異がさらなる家系においてもまた同定されている (Escayg 他、2000)。これらの変異 (T875M および R1648H) は、チャンネルのゲート開

閉の際に役割を有することが知られている、チャンネルの非常に保存された S 4 膜貫通セグメントに存在する。S C N 4 A (R 1 4 6 0 H) の同じ保存された領域における R 1 6 4 8 H 変異の機能的研究により、変異型チャンネルの不活性化の経時変化がわずかに遅くなっていること、そして野生型のチャンネルと比較したとき、不活性化からの回復が促進されていることが示されている (A l e k o v 他、2 0 0 0) 。従って、活性化および早い不活性化におけるその様々な微細な変化の組合せは、てんかんを生じさせるためには十分である。G E F S + は、明らかに、強い遺伝的基礎、不完全な浸透度、ならびに遺伝的不均一性および表現型の不均一性を有する一般的な複合障害である。熱性発作が集団の 3 % で発生しており、そのため、この表現型は、G E F S + 遺伝子の結果として発生することに加えて、G E F S + の家系では散発的に発生し得る (W a l l a c e 、1 9 9 8) 。
また、いくつかの家系では、影響が大きい常染色体優性遺伝子が分離するが、多くの場合には、双直系性などの臨床的な遺伝的証拠により、いくつかの小さい家系については、この障害が多因性であることが示唆される (S i n g h 他、1 9 9 9) 。

10

【0008】

S C N 1 A および S C N 1 B の変異が G E F S + では珍しいにもかかわらず、S C N 1 B 遺伝子における新規な変異が罹患家系において同定されている。従って、てんかんにおいて S C N 1 遺伝子が関与する頻度は、最初の予想よりも大きいと考えられる。

【0009】

発明の開示

本発明者らは、てんかん、具体的には、熱性発作プラスである全身性てんかん (G E F S +) と関連する、電位依存性ナトリウムチャンネルの $\beta - 1$ サブユニット (S C N 1 B) における新規な変異を同定した。

20

【0010】

1 つの実施形態において、本発明は、電位依存性ナトリウムチャンネルの変異型 $\beta - 1$ サブユニットをコードする単離された哺乳動物核酸分子を提供する。この場合、変異事象が生じており、その変異事象は、組み立てられたナトリウムチャンネルの機能発現を、てんかんの表現型が生じるように妨げているが、ただし、前記変異事象は、コードされるポリペプチドにおける C 1 2 1 W 置換をもたらす変異事象ではない。具体的には、変異は、S C N 1 B のアミノ末端ドメインの細胞外ループにおいてアミノ酸位 8 5 に存在する。

【0011】

本発明の 1 つの形態において、変異は S C N 1 B の第 3 エキソンに存在し、アミノ酸位 8 5 においてシステイン残基によるアルギニン残基の置換をもたらす。この R 8 5 C 変異は、配列番号 1 に示されるような S C N 1 B コード配列の 2 5 3 位における、C から T へのヌクレオチド置換の結果として生じる。好ましくは、変異は、熱性発作プラスである全身性てんかんの表現型をもたらす。

30

【0012】

本発明のヌクレオチド配列は、様々な目的のためにこの分野で受け入れられている方法を使用して操作することができる。これらには、遺伝子産物のクローニング、プロセッシングおよび／または発現の改変が含まれるが、これらに限定されない。遺伝子フラグメントの P C R による再組み立て、および合成オリゴヌクレオチドの使用により、本発明のヌクレオチド配列を操作することが可能になる。例えば、オリゴヌクレオチド媒介の部位特異的変異誘発により、新しい制限部位をもたらす、発現パターンを変化させ、そしてスプライス変化体を生じさせることなどのさらなる変異を導入することができる。

40

【0013】

遺伝暗号の縮重の結果として、既知の天然に存在する遺伝子のいずれかのポリヌクレオチド配列に対する最小の類似性をいくつか有し得る数多くのポリヌクレオチド配列を作製することができる。従って、本発明には、可能なコドン選択に基づいて様々な組合せを選択することによって作製することができるポリヌクレオチド配列の可能な変化がどれもすべて含まれる。これらの組合せは、本発明のポリヌクレオチド配列に適用されるような標準的なトリプレット遺伝暗号に従って作製され、従って、そのような変化はすべて明確に

50

開示されていると見なすことができる。

【0014】

本発明のDNA分子は、cDNA、ゲノムDNA、合形成態、および混合ポリマーを、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方とも包含し、そして化学的もしくは生化学的に改変することができ、または当業者によって理解されるような非天然型ヌクレオチド塩基もしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むことができる。そのような改変には、標識、メチル化、インターカレーター、アルキル化体、および改変された連結が含まれる。場合により、本発明のポリヌクレオチド配列のコドン使用とは実質的に異なるコドン使用を有するヌクレオチド配列を作製することは好都合であり得る。例えば、コドンは、特定のコドンが宿主によって利用される頻度と一致させて、特定の原核生物宿主または真核生物宿主におけるペプチドの発現速度を増大させるために選択することができる。コードされるアミノ酸配列を変化させることなくヌクレオチド配列を変化させるための他の理由には、天然に存在する変異型配列から産生される転写物よりも望ましい性質（例えば、より大きい半減期など）を有するRNA転写物を産生させることが含まれる。

【0015】

本発明にはまた、完全に合成化学によって本発明のDNA配列を製造することが含まれる。合成された配列は、好適な宿主における挿入されたコード配列の転写制御および翻訳制御に必要なエレメントを含有する発現ベクターおよび細胞系に導入することができる。これらのエレメントには、調節配列、プロモーター、5'側および3'側の非翻訳領域、ならびに本発明のポリヌクレオチドをコードする配列のより効率的な翻訳を可能にする特異的な開始シグナル（ATG開始コドンおよびKozakコンセンサス配列など）を挙げることができる。開始コドンおよび上流の調節配列を含む完全なコード配列が適切な発現ベクターに挿入される場合、さらなる制御シグナルが必要でない場合がある。しかし、コード配列のみ、またはそのフラグメントが挿入される場合には、上記に記載されるような外因性の翻訳制御シグナルをベクターによって提供しなければならない。そのようなシグナルは様々な起源のものであってもよく、天然起源および合成起源の両方が可能である。発現効率は、使用される特定の宿主細胞系に対して適切なエンハンサーを含めることによって高めることができる（Scharf他、1994）。

【0016】

本発明にはまた、本明細書中に記載される配列の相補体である核酸分子が含まれる。

【0017】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたはその変化体に由来する精製されたポリペプチドまたはタンパク質の製造を可能にする。これを行うために、宿主細胞を、上記に記載されるようなDNA分子で形質転換することができる。典型的には、前記宿主細胞は、本発明によるDNA分子を含む発現ベクターでトランスフェクションされる。様々な発現ベクター／宿主システムを、本発明のポリペプチドをコードする配列を含有し、発現させるために利用することができる。これらには、プラスミドまたはコスミドのDNA発現ベクターで形質転換された細菌などの微生物；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞システム；あるいはマウスまたは他の動物またはヒトの組織細胞系が含まれるが、これらに限定されない。哺乳動物細胞を、プラスミドシステム、コスミドシステム、およびワクシニアウイルス発現システムなどのウイルスシステムを含む様々な発現ベクターを使用してタンパク質を発現させるために使用することができる。本発明は、用いられる宿主細胞によって限定されない。

【0018】

本発明のポリヌクレオチド配列またはその変化体は、哺乳動物システムにおける組換えタンパク質の長期間の製造を可能にするための細胞株において安定的に発現させることができる。本発明のポリペプチドをコードする配列は、ウイルスの複製起点および／または内因性の発現エレメント、そして同じベクターまたは別のベクターにおける選択マーカー遺伝子を含有し得る発現ベクターを使用して細胞株に形質転換することができる。選択マー

カーにより、選択剤に対する耐性が付与され、その存在により、導入された配列の発現に成功した細胞の増殖および回収が可能になる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、細胞タイプに対して適切な組織培養技術を使用して増殖させることができる。

【0019】

形質転換された細胞によって産生されるタンパク質は、使用された配列および／またはベクターに依存して分泌され得るか、または細胞内に保持され得る。当業者によって理解されるように、タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターは、原核生物または真核生物の細胞膜を介したタンパク質の分泌を行わせるシグナル配列を含有するように設計することができる。

【0020】

さらに、宿主細胞系統を、挿入された配列の発現を調節するその能力について、または所望する様式で発現タンパク質をプロセッシングするその能力について選ぶことができる。ポリペプチドのそのような修飾には、アセチル化、グリコシル化、リン酸化およびアシル化が含まれるが、これらに限定されない。タンパク質の「プレプロ」形態の翻訳後切断もまた、タンパク質の標的化、折り畳み、および／または活性を特徴づけるために使用することができる。翻訳後活性に対する特定の細胞装置および特徴的な機構を有する種々の宿主細胞（例えば、CHO細胞またはHeLa細胞）を、American Type Culture Collection (ATCC) から得ることができ、そして外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするために選ぶことができる。

【0021】

多量の遺伝子が、抗体製造などのために必要なときには、このタンパク質の高レベルの発現を行わせるベクターを使用することができ、例えば、T5またはT7の誘導可能なバクテリオファージプロモーターを含有するベクターを使用することができる。本発明にはまた、タンパク質の重要な機能的ドメインを含有する融合タンパク質を作製および単離することにおける上記に記載される発現システムの使用が含まれる。これらの融合タンパク質は、結合研究、構造研究および機能研究のために、ならびに適切な抗体の作製のために使用される。

【0022】

タンパク質を融合タンパク質として発現および精製するために、本発明の適切なポリヌクレオチド配列が、別のペプチド（例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）をコードするヌクレオチド配列を含有するベクターに挿入される。融合タンパク質は原核生物細胞または真核生物細胞から発現および回収される。その後、融合タンパク質は、融合ベクター配列に基づくアフィニティークロマトグラフィーによって精製することができる。所望するタンパク質は、その後、融合タンパク質を酵素切断することにより得られる。

【0023】

本発明のポリペプチドのフラグメントはまた、固相技術を使用する直接的なペプチド合成によって製造することができる。自動化された合成を、ABI 431A ペプチド合成機 (Perkin-Elmer) を使用することによって達成することができる。本ペプチドの様々なフラグメントを別々に合成し、その後、組み合わせて、全長の分子を得ることができる。

【0024】

さらに別の局面により、本発明は、電位依存性ナトリウムチャンネルの変異型 $\beta-1$ サブユニットである単離された哺乳動物ポリペプチドを提供する。この場合、変異事象が生じており、その変異事象は、組み立てられたナトリウムチャンネルの機能発現を、てんかんの表現型が生じるように妨げているが、ただし、前記変異事象はC121W置換ではない。具体的には、変異は、SCN1Bのアミノ末端ドメインの細胞外ループにおいてアミノ酸位85に存在する。

【0025】

本発明の1つの形態において、変異事象は、配列番号2に示されるようなSCN1Bタンパク質のアミノ酸位85において、アルギニン残基がシステイン残基で置換される置換で

10

20

30

40

50

ある。

【0026】

本発明のさらに別の局面により、哺乳動物の組み立てられた電位依存性ナトリウムチャンネルである単離されたポリペプチド複合体が提供される。この場合、変異事象がその β -1サブユニットに生じており、その変異事象は、組み立てられたナトリウムチャンネルの機能発現を妨げている。好ましくは、変異が、このチャンネルのSCN1Bサブユニットのアミノ酸位85に存在する。

【0027】

さらなる局面において、変異はSCN1BにおけるR85C変異である。

【0028】

本発明の別の局面により、哺乳動物の電位依存性ナトリウムチャンネルの変異型SCN1Bサブユニットであるポリペプチドを調製する方法が提供される。この方法は下記の工程を含む：

(1) 上記に記載されるような核酸分子を含む発現ベクターでトランスフェクションされた宿主細胞を、ポリペプチドを産生させるために効果的な条件のもとで培養する工程；および

(2) 変異型SCN1Bサブユニットを集める工程。

【0029】

変異型SCN1Bサブユニットはまた、細胞によって同時発現され得るナトリウムチャンネルの別のサブユニットと会合させてもよく、それにより、会合した変異型SCN1Bサブユニットが集められる。

【0030】

本発明のさらに別の局面により、上記に記載されるプロセスの生成物であるポリペプチドが提供される。

【0031】

実質的に精製されたタンパク質またはそのフラグメントは、その後、例えば、タンパク質の結晶のX線結晶学によって、または核磁気共鳴(NMR)によって二次構造および三次構造を明らかにするために、さらなる生化学的分析において使用することができる。構造決定により、変異型ナトリウムチャンネルと相互作用させるか、あるいはナトリウムチャンネルの全体的な電荷配置または他のタンパク質との電荷相互作用を変化させるか、あるいは細胞内におけるその機能を変化させるための医薬品を合理的に設計することが可能になる。

【0032】

てんかんに関与する新しい変異がSCN1Bにおいて同定されたことにより、本発明の変異型ナトリウムチャンネル β -1サブユニットは、熱性発作プラスである全身性てんかん（これに限定されない）を含むてんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を処置するための治療的方法を可能にすることが理解される。本発明の変異型SCN1Bサブユニットはまた、上記に記載されるような障害に冒されている個体における変異した遺伝子または遺伝子産物の存在についてスクリーニングし、その存在を検出するための診断的適用において有用である。

【0033】

治療的適用

本発明の1つの局面により、てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を処置する方法で、ナトリウムチャンネルが、上記に記載されるような変異、より具体的には、チャンネルを構成するSCN1Bサブユニットのアミノ酸位85における変異を含有するとき、ナトリウムチャンネルの選択的なアンタゴニストまたはアゴニストまたは調節剤を投与することを含む方法が提供される。

【0034】

本発明のさらに別の局面において、ナトリウムチャンネルの選択的なアンタゴニストまたはアゴニストまたは調節剤の使用で、ナトリウムチャンネルが、上記に記載されるような

10

20

30

40

50

変異、より具体的には、チャンネルを構成する S C N 1 B サブユニットのアミノ酸位 8 5 における変異を含有し、前記変異が、てんかんを含む障害の原因であるとき、その障害を処置するための医薬品を製造することにおけるそのような使用が提供される。

【0035】

本発明の 1 つの局面において、好適なアゴニストまたはアンタゴニストまたは調節剤は、本発明の一部を形成する様々な S C N 1 B 変異を含有するナトリウムチャンネルに野生型の機能を回復させるか、または変異型チャンネルが細胞機能に対して有する影響を無効にする。

【0036】

この分野で広く知られている様々な方法を使用することにより、変異型ナトリウムチャンネルは、疾患の原因である変異型チャンネルに対して特異的な抗体を製造するために、または薬学的薬剤のライブラリーをスクリーニングして、変異型ナトリウムチャンネルと結合する薬学的薬剤を同定するために使用することができる。

10

【0037】

1 つの局面において、本発明の変異型ナトリウムチャンネルまたは変異型 S C N 1 B サブユニットに特異的に結合する抗体は、アンタゴニストまたは調節剤として直接的に使用することができ、あるいは変異型ナトリウムチャンネルを発現する細胞または組織に薬学的薬剤を導くための標的化機構または送達機構として間接的に使用することができる。

【0038】

本発明のさらにさらなる局面において、上記に記載されるようなポリペプチドとの免疫学的反応性を有するが、野生型ナトリウムチャンネルまたはその S C N 1 B サブユニットとは反応しない抗体が提供される。

20

【0039】

詳細には、疾患の原因である本発明の S C N 1 B サブユニット変異を含有する組み立てられたナトリウムチャンネルに対する抗体が提供される。そのような抗体には、当業者によって理解されるように、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体および単鎖抗体を挙げることができるが、これらに限定されない。

【0040】

抗体を製造する場合、ウサギ、ラット、ヤギ、マウスおよびヒトなどを含む様々な宿主を、免疫原的性質を有する記載されるようなポリペプチドまたはその任意のフラグメントもしくはオリゴペプチドを注射することによって免疫化することができる。様々なアジュバントを、免疫学的応答を増大させるために使用することができ、これには、フロイントのアジュバント、無機ゲル（水酸化アルミニウムなど）および界面活性物質（リソレシチンなど）が含まれるが、これらに限定されない。ヒトにおいて使用されるアジュバントには、B C G（カルメットーゲラン菌）およびコリネバクテリウム・パルブムが含まれる。

30

【0041】

変異型ナトリウムチャンネルに対する抗体を誘導するために使用されるオリゴペプチドまたはペプチドまたはフラグメントは、少なくとも 5 個のアミノ酸（より好ましくは、少なくとも 10 個のアミノ酸）からなるアミノ酸配列を有することが好ましい。これらのオリゴペプチドまたはペプチドまたはフラグメントは、天然タンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であり、かつ天然に存在する小分子のアミノ酸配列全体を含有することもまた好ましい。ナトリウムチャンネルアミノ酸の短い領域を、K L H などの別のタンパク質の領域と融合させることができ、そのようなキメラ分子に対する抗体を製造することができる。

40

【0042】

変異型ナトリウムチャンネルに対するモノクローナル抗体を、連続した細胞株による抗体分子の培養での製造をもたらす任意の技術を使用して調製することができる。このような技術には、ハイブリドーマ技術、ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術および E B V - ハイブリドーマ技術が含まれるが、これらに限定されない（例えば、K o h l e r 他、1975；K o z b o r 他、1985；C o t e 他、1983；C o l e 他、1984 を参照のこと

50

）。

【0043】

抗体はまた、文献に開示されるように、リンパ球集団におけるインビボでの製造を誘導することによって、または免疫グロブリンライブラリー、もしくは非常に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによって製造することができる（例えば、O r l a n d i 他、1989；W i n t e r 他、1991を参照のこと）。

【0044】

変異型ナトリウムチャンネルに対する特異的な結合部位を含有する抗体フラグメントもまた作製することができる。例えば、そのようなフラグメントには、抗体分子をペプシン消化することによって製造されるF (a b ') 2フラグメント、およびF (a b ') 2フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって作製されるF a bフラグメントが含まれる。あるいは、F a b発現ライブラリーを、所望する特異性を有するモノクローナルF a bフラグメントの迅速かつ容易な同定を可能にするために構築することができる（例えば、H u s e 他、1989を参照のこと）。

10

【0045】

様々な免疫アッセイを、所望する特異性を有する抗体を同定するためのスクリーニングのために使用することができる。特異性が明らかにされたポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかを使用する競合的結合アッセイまたは免疫放射測定アッセイに対する多数のプロトコルがこの分野で広く知られている。そのような免疫アッセイは、典型的には、ナトリウムチャンネルとその特異的な抗体との間における複合体形成を測定することを伴う。妨害しない2つのナトリウムチャンネルエピトープに対して反応し得る抗体を利用する2部位モノクローナル型免疫アッセイが好ましいが、競合的結合アッセイもまた用いることができる。

20

【0046】

本発明のさらなる局面において、てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を処置する方法で、上記に記載されるDNA分子のいずれか1つの相補体（アンチセンス）であり、本発明の変異型ナトリウムチャンネル β -1サブユニットをコードするmRNAとハイブリダイゼーションするRNA分子をコードする単離されたDNA分子を、そのような処置を必要とする被験体に投与することを含む方法が提供される。

30

【0047】

典型的には、本発明のポリヌクレオチドの相補体を発現するベクターを、そのような処置を必要とする被験体に投与することができる。アンチセンス法では、アンチセンスオリゴヌクレオチドの使用、アンチセンスRNAの注射、リボザイム、DNAザイム、およびアンチセンスRNA発現ベクターのトランスフェクションを含む様々な方法を使用することができる。ベクターを細胞内または組織内に導入するための多くの方法を利用することができる。それらは、インビボ、インビトロおよびエクスピボでの使用に等しく適している。エクスピボ治療の場合、ベクターを、患者から採取され、その同じ患者への自家移植のためにクローン増殖させた幹細胞に導入することができる。トランスフェクションまたはリポソーム注射またはポリカチオン性アミノポリマーによる送達を、この分野で広く知られている様々な方法を使用して達成することができる（例えば、G o l d m a n 他、1997を参照のこと）。

40

【0048】

本発明のさらにさらなる局面において、本発明のDNA分子の相補体であり、本発明の変異型ナトリウムチャンネル β -1サブユニットをコードするmRNAとハイブリダイゼーションするRNA分子をコードする単離されたDNA分子の使用で、てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を処置するための医薬品を製造することにおいてそのような使用が提供される。

【0049】

場合により、処置に対する適切な方法は混合療法であり得る。これは、野生型ナトリウム

50

チャンネルの形成レベルを正常なレベルに回復させることができる野生型 S C N 1 B の投与と組み合わせて、本発明の変異型 S C N 1 B サブユニットまたは変異型ナトリウムチャンネルに対する抗体または相補体を、その機能的作用を阻害するために投与することを伴い得る。野生型 S C N 1 B は、相補体の投与について上記に記載されるような遺伝子治療法を使用して投与することができる。

【0050】

従って、本発明の変異型 S C N 1 B サブユニットまたは変異型ナトリウムチャンネルに対する抗体または相補体を野生型 S C N 1 B の投与との組合せで投与することを含む、てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を処置する方法が提供される。

10

【0051】

本発明のさらに別の局面において、本発明の変異型 S C N 1 B サブユニットまたは変異型ナトリウムチャンネルに対する抗体または相補体の使用で、てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を処置するための医薬品を製造することにおいて、野生型 S C N 1 B の使用と組み合わせたそのような使用が提供される。

【0052】

さらなる局面において、好適なアゴニストまたは調節剤には、上記に記載されるような β -1 サブユニット内の変異を含有するナトリウムチャンネルの野生型活性を回復させることができるペプチドまたはホスホペプチドまたは小さい有機化合物もしくは無機化合物を挙げることができる。

20

【0053】

治療的適用に好適なペプチドまたはホスホペプチドまたは小さい有機化合物もしくは無機化合物は、下記に記載されるような薬物スクリーニング適用において本発明の核酸およびペプチドを使用して同定することができる。このようなスクリーニングから同定された分子もまた、分子が、これらの変異および本発明の変異によって負わされる共通する根本的な機能的欠陥を正すことができるならば、他のナトリウムチャンネル遺伝子変異を有する罹患個体、またはナトリウムチャンネル以外の遺伝子に変異を有する個体において治療的に適用することができる。

【0054】

従って、ナトリウムチャンネルの変異を有する個体、またはナトリウムチャンネル以外の遺伝子に変異を有する個体において、てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を処置する方法で、ナトリウムチャンネルの好適なアゴニストまたは調節剤である、本発明の変異型ナトリウムチャンネルサブユニットを使用して同定された化合物を投与することを含む方法が提供される。

30

【0055】

さらなる実施形態において、本発明のアゴニスト、アンタゴニスト、調節剤、抗体、相補的配列またはベクターはいずれも、単独で投与することができ、または他の適切な治療剤と組み合わせて投与することができる。適切な薬剤の選択は、従来の薬学的原理に従って当業者によって行うことができる。治療剤の組合せは相乗的に作用して、てんかんの処置または防止をもたらし得る。この方法を使用して、より少ない投薬量のそれぞれの薬剤を用いた治療効力を可能にすることができ、従って、有害な副作用に対する潜在的可能性を低下させることができる。

40

【0056】

上記に記載された治療的方法はどれも、例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル、そして最も好ましくはヒトなどの哺乳動物を含む、そのような治療を必要とする任意の被験体に適用することができる。

【0057】

薬物スクリーニング

本発明のさらに別の局面により、本発明のペプチド（具体的には、精製された変異型ナトリウムチャンネル β -1 サブユニットポリペプチド）およびこれらを発現する細胞は、様

50

々なアッセイにおいて候補の薬学的化合物をスクリーニングするために有用である。

【0058】

なおさらに、本発明は、候補の薬学的薬剤をスクリーニングするためのポリペプチドまたはポリペプチド複合体の使用を提供する。

【0059】

なおさらに、本発明は、高処理能スクリーニング技術が用いられる使用を提供する。

【0060】

本発明に従ってスクリーニングされ得る化合物には、ペプチド（可溶性ペプチドなど）、ホスホペプチド、および小さい有機分子または無機分子（天然産物または合成された化学ライブラリーおよびペプチド模倣体など）が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0061】

1つの実施形態において、スクリーニングアッセイには、本発明のポリペプチドまたはフラグメントを発現する、組換え分子で安定的に形質転換されている真核生物宿主細胞または原核生物宿主細胞を競合的結合アッセイにおいて利用する細胞型アッセイが含まれる。結合アッセイでは、変異型ナトリウムチャンネル β -1サブユニットのポリペプチドまたはフラグメントと、試験されている化合物との間における複合体の形成が測定されるか、あるいは試験されている化合物が、変異型ナトリウムチャンネル β -1サブユニットのポリペプチドまたはフラグメントと既知のリガンドとの間における複合体の形成を妨害する程度が測定される。

【0062】

本発明は、形質転換された細胞、トランスフェクションもしくは注入された卵母細胞、または変異型ナトリウムチャンネル β -1サブユニットを有する動物モデル（遺伝子組換え動物または遺伝子標的化（ノックイン）動物（下記参照）など）において本発明のポリペプチドを使用することによって化合物をスクリーニングするために特に有用である。薬物候補物を、変異型SCN1Bサブユニットを発現する培養細胞（野生型ナトリウムチャンネル α サブユニットもまた発現しているはずである）に加えることができ、あるいは変異型SCN1Bサブユニットおよび野生型ナトリウムチャンネル α サブユニットの両方でトランスフェクションされた卵母細胞に、またはそれらの両方が注入された卵母細胞に加えることができ、あるいは変異型SCN1Bサブユニットを含有する動物モデルに投与することができる。変異型ナトリウムチャンネルの活性を調節する試験化合物の能力を測定することは、例えば、チャンネルの電流（例えば、ナトリウムイオンの流れ）に対する影響を、野生型ナトリウムチャンネルを含有する細胞または動物の電流と比較して測定することによって達成することができる。細胞内の電流は、パッチークランプ技術（Hamill他（1981）に記載される方法）を使用して測定することができ、またはこの分野で知られているような、蛍光に基づくアッセイ（Gonzalez他（1999）を参照のこと）を使用して測定することができる。電流をより正常なレベルな方に変化させる薬物候補物は、てんかん、ならびにナトリウムチャンネル機能不全と関連する他の障害を処置または防止するために有用である。

20

30

【0063】

薬物スクリーニングのための別の技術では、変異型ナトリウムチャンネル β -1サブユニットポリペプチドまたはこれらを含有するナトリウムチャンネルに対する好適な結合親和性を有する化合物に対する高処理能スクリーニングが提供される（PCT国際特許出願公開WO84/03564を参照のこと）。この言及された技術では、非常に多数の小さいペプチド試験化合物を、固体基体（マイクロタイタープレートなど）の表面で合成することができ、そして（単独で、またはナトリウムチャンネル α サブユニットとの複合体で）変異型SCN1Bサブユニットポリペプチドとの結合についてアッセイすることができる。その後、結合した変異型ナトリウムチャンネルまたは変異型SCN1Bサブユニットポリペプチドがこの分野で広く知られている方法によって検出される。この技術の変形では、本発明の精製されたポリペプチドをプレート表面に直接コーティングして、相互作用する試験化合物を同定することができる。

40

50

【0064】

本発明ではまた、変異型ナトリウムチャンネルと特異的に結合し得る中和抗体が、それに対する結合について試験化合物と競合する競合薬物スクリーニングアッセイの使用が考えられる。このようにして、そのような抗体は、変異型ナトリウムチャンネルの抗原性決定基の1つ以上をとともに有するペプチドの存在を検出するために使用することができる。

【0065】

本発明のポリペプチドはまた、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ために使用することができる。これは、ポリペプチドの活性を調節するその能力について非常に多数の異なる物質を試験する方法を提供する。ポリペプチド機能の調節剤として同定された物質はペプチド性または非ペプチド性であってもよい。非ペプチド性の「小分子」が、多くの場合には、インビボでの多くの薬学的適用のために好ましい。また、そのような物質の模倣体または模擬体を薬学的使用のために設計することができる。知られている薬学的に活性な化合物（「リード」化合物）に基づく模擬体の設計は、新規な医薬品を開発するための一般的な方法である。これは、多くの場合、元の活性な化合物が合成困難であるか、もしくは合成に費用がかかる場合に、または元の活性な化合物が好適な投与方法をもたらない場合に望ましい。模擬体の設計では、標的の性質を決定する際に重要である、元の活性な化合物の特定の部分が同定される。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ルマコホアとして知られている。ファルマコホアが見出されると、ファルマコホアの構造が、X線回折データおよびNMRを含む一連の提供源から得られるデータを使用してその物理的性質に従ってモデル化される。その後、ファルマコホアを模倣する化学基を加えることができるテンプレート分子が選択される。この選択は、模擬体が容易に合成され、薬理学的に受容可能であり、インビボで分解せず、かつリード化合物の生物学的活性を保持するように行うことができる。さらなる最適化または改変を、インビボ試験または臨床試験のために有用な1つまたは複数の最終的な模擬体を選択するために行うことができる。

10

20

【0066】

標的特異的な抗体を単離し、その後、その結晶構造を解明することもまた可能である。原理的には、この方法により、その後の薬物設計が上記に記載されたように基づき得るファルマコホアが得られる。薬理学的に活性な機能的抗体に対する抗イディオタイプ抗体（anti-id）を作製することによってタンパク質結晶学を全く避けることが可能になる場合がある。鏡像の鏡像として、anti-idの結合部位が元の受容体のアナログであることが予想される。その後、anti-idを使用して、化学的または生物学的に製造されたペプチドバンクからペプチドを単離することができる。

30

【0067】

本発明の変異型の核酸およびポリペプチドの使用に基づく、上記に記載されるようなスクリーニング手法によって同定された化合物はまた、他のナトリウムチャンネルサブユニット変異を含む罹患個体における他の遺伝子変異によって負わされる機能的欠陥を正すことに対するその作用について試験することができる。

【0068】

そのような化合物は、これらおよび薬学的に受容可能なキャリアを含有する薬学的組成物が本発明の一部を形成するように本発明の一部を形成する。

40

【0069】

薬学的調製物

スクリーニングアッセイから同定され、かつナトリウムチャンネルの野生型活性を回復させることが示された化合物は、てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を処置し、または改善させるために、治療有効量で患者に投与することができる。治療有効量は、てんかんの症状の改善をもたらすために十分な化合物のそのような量を示す。

【0070】

そのような化合物の毒性および治療効力は、細胞培養または実験動物における標準的な薬

50

学的手法により決定することができる。これらの研究から得られたデータは、その後、ヒトにおける使用に対する一連の投薬量を定める際に使用することができる。

【0071】

本発明に従って使用される薬学的配合物は、広く知られている1つ以上の生理学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤または安定化剤を使用して従来の様式で配合することができる。受容可能なキャリアまたは賦形剤または安定化剤は、用いられた投薬量および濃度において非毒性であり、これらには、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなど；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマーを含む結合剤；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシンなど；単糖類、二糖類および他の炭水化物、これには、グルコース、マンノースまたはデキストリンが含まれる；EDTAなどのキレート化剤；糖アルコール、例えば、マンニトールまたはソルビトールなど；ナトリウムなどの塩形成対イオン；および／または非イオン性界面活性剤、例えば、ツイーン、プルロニックスまたはポリエチレングリコール（PEG）などが含まれる。

10

【0072】

本発明に従って使用される薬学的組成物の配合は、提案された投与経路に基づく。投与経路には、吸入投与、吹送投与（口または鼻のいずれかを介して）、経口投与、口内投与、直腸投与または非経口投与を挙げることができるが、これらに限定されない。

【0073】

20

診断的適用

本発明のポリヌクレオチド配列は、てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を診断するために使用することができる。従って、これらの障害の診断における本発明の核酸分子の使用が考えられる。

【0074】

本発明の別の実施形態において、診断目的のために使用することができるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、ゲノムDNA分子ならびに相補的なRNA分子およびDNA分子が含まれる。ポリヌクレオチドは、生物学的サンプルにおける遺伝子発現を検出および定量するために使用することができる。診断のために使用されるゲノムDNAは、血液、組織生検物、手術試料または剖検物に存在する細胞などの、身体の細胞から得ることができる。DNAを単離して、特定の配列を検出するために直接使用することができる。あるいは、DNAは、分析に先立ってポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅することができる。同様に、RNAまたはcDNAもまた、PCR増幅とともに、またはPCR増幅を伴うことなく使用することができる。特定の核酸配列を検出するために、特異的なオリゴヌクレオチドを使用するハイブリダイゼーション、PCRマッピング、RNAse保護、および様々な他の方法を用いることができる。例えば、患者のナトリウムチャンネルサブユニットに由来する増幅産物の直接的なヌクレオチド配列決定を用いることができる。サンプルアンプリコンの配列が、ヌクレオチドの違いの存在（または非存在）を明らかにするために野生型アンプリコンの配列と比較される。また、制限酵素消化および制限酵素マッピングを、本発明に記載されるSCN1BサブユニットにおけるCからTへの特異的な変異に対して用いることができる。このサブユニットのアミノ酸残基85におけるCからTへのトランジションはCfoI制限部位を破壊する。罹患個体ならびに正常なコントロールから得られたDNAを、CからTへのこのヌクレオチド変異を挟むオリゴヌクレオチドを使用して増幅することができる。増幅産物は、その後、野生型SCN1BのDNAフィンガープリントと比較するためのフィンガープリントを得るためにCfoIによって消化することができる。本発明のCからTへのヌクレオチド変異を含有する個体由来するDNAはこの酵素で消化することができず、しかしながら、正常な個体から増幅されたDNAはCfoIで消化される。

30

40

【0075】

本発明のさらなる局面により、てんかん、ならびにナトリウムチャンネルの機能不全と関

50

連する他の障害を診断する際における、上記に記載されるような、ポリヌクレオチドの使用が提供される。

【0076】

診断アッセイが、ナトリウムチャンネルを構成する変異型SCN1Bタンパク質に基づき得るときには、様々な方法が可能である。例えば、診断を、ナトリウムチャンネルの一部を形成する正常型および変異型のSCN1Bサブユニットタンパク質の電気泳動移動度の違いをモニターすることによって達成することができる。そのような方法は、電荷置換が存在する変異体、または、挿入、欠失もしくは置換により、得られるタンパク質の電気泳動移動における著しい変化が生じている変異体を同定する際には特に有用である。あるいは、診断は、正常型タンパク質および変異型タンパク質のタンパク質分解的切断パターンの違い、または様々なアミノ酸残基のモル比の違いに基づいてもよく、あるいは遺伝子産物の変化した機能を明らかにする機能的アッセイによって基づいてもよい。

10

【0077】

別の局面において、変異型ナトリウムチャンネルと特異的に結合する抗体を、障害の診断のために使用することができ、あるいは変異型ナトリウムチャンネルのアゴニストまたはアンタゴニストまたは調節剤で処置されている患者をモニターするためのアッセイにおいて使用することができる。診断目的のために有用な抗体は、治療剤について上記に記載されたのと同じ方法で調製することができる。変異型ナトリウムチャンネルを検出するための診断アッセイには、ヒト体液または細胞もしくは組織の抽出物における変異型ナトリウムチャンネルを検出するために抗体および標識を利用する方法が含まれる。抗体は、修飾とともに、または修飾を伴うことなく使用することができ、そしてレポーター分子の共有結合的または非共有結合的な結合によって標識することができる。

20

【0078】

変異型ナトリウムチャンネルの存在を測定するための様々なプロトコルには、ELISA、RIAおよびFACSが含まれ、そのようなプロトコルは、この分野で広く知られており、てんかん（特に、熱性発作プラスである全身性てんかん）を診断するための基礎を提供する。変異型チャンネルの発現は、試験哺乳動物被験体（好ましくは、ヒト）から採取された体液または細胞抽出物を、複合体形成に好適な条件のもとで、そのチャンネルに対する抗体と一緒にすることによって明らかにされる。複合体形成の量を、様々な方法によって、好ましくは、光度法による手段によって定量化することができる。変異型チャンネルに対して特異的な抗体は、その変異型チャンネルを発現している個体に結合するだけであり、野生型チャンネルのみを発現している個体（すなわち、正常な個体）には結合しない。これにより、疾患を診断するために基礎が確立される。

30

【0079】

個体が障害に関して診断されると、効果的な処置を開始することができる。これらには、変異型チャンネルの選択的な調節剤または変異型チャンネルに対するアンタゴニスト（上記に記載されるような抗体または変異型相補体など）を投与することが含まれ得る。代わりの処置には、チャンネルの機能を正常なレベルに回復させるように、変異型チャンネルに対する選択的なアゴニストまたは調節剤を投与することが含まれる。

【0080】

40

マイクロアレイ

さらなる実施形態において、本明細書中に記載されるポリヌクレオチド配列のいずれかに由来する完全なcDNAまたはオリゴヌクレオチドまたはより長いフラグメントを、マイクロアレイにおけるプローブとして使用することができる。マイクロアレイは、非常に多数の遺伝子の発現レベルを同時にモニターするために、そして遺伝子の変化体および変異および多型を同定するために使用することができる。この情報を使用して、遺伝子機能を決定することができ、障害の遺伝的基礎を理解することができ、障害を診断することができ、そして治療剤を開発し、その活性をモニターするために使用することができる。マイクロアレイは、この分野で知られている方法を使用して調製し、使用し、かつ分析することができる（例えば、Schena他、1996; Heller他、1997を参照のこ

50

と)。

【0081】

本発明のさらなる局面により、特定のナトリウムチャンネル β -1サブユニットのヒト変異(特に、本発明において開示される変異)を同定することの結果として作製された動物モデルから得られた神経学的材料を、様々なマイクロアレイ実験において使用することができる。これらの実験は、正常なコントロールの脳組織とは対照的に、てんかんの脳組織において、特定のナトリウムチャンネル β -1サブユニットの発現レベル、または全脳ライブラリーに由来する任意のcDNAクローンの発現レベルを同定するために行うことができる。2つの組織の間における、ナトリウムチャンネル β -1サブユニットを含む様々な遺伝子の発現レベルの変動により、てんかんプロセスにおけるそれらの関与が、動物モデルに存在する元のナトリウムチャンネル変異の原因として、またはその変異の結果として、そのいずれかで示される。マイクロアレイは、上記に記載されるように調製することができる。

10

【0082】

形質転換された宿主

本発明ではまた、本発明の核酸分子で形質転換された遺伝子改変(ノックアウト、ノックインおよび遺伝子組換え)の非ヒト動物モデルの作製が提供される。これらの動物は、ナトリウムチャンネルの機能を研究するために、ナトリウムチャンネルに関連するような疾患機構を研究するために、候補の薬学的化合物をスクリーニングするために、変異型ナトリウムチャンネルを発現する体外培養される哺乳動物細胞培養物を作製するために、そして可能性のある治療的介入を評価するために有用である。

20

【0083】

本発明の動物モデルにおける使用のために好適である動物種には、ラット、マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、およびヒト以外の霊長類(サルおよびチンパンジーなど)が含まれるが、これらに限定されない。最初の研究のためには、ノックイン動物、ノックアウト動物および遺伝子組換え動物の作製が比較的容易であるために、それらの飼育が容易であるために、そして寿命がより短いために、遺伝子改変されたマウスおよびラットが非常に望ましい。いくつかの研究のためには、迅速なスクリーニングが可能であり、そしてはるかにより容易な取扱いがもたらされるので、遺伝子組換えされた酵母または無脊椎動物が好適であり、好まれる場合がある。より長期間の研究のためには、ヒト以外の霊長類が、ヒトとのその類似性のために所望されることがある。

30

【0084】

本発明の変異型ナトリウムチャンネルに対する動物モデルを作製するために、いくつかの方法を用いることができる。これらの方法には、相同的な動物遺伝子において特定の変異を生じさせること、野生型のヒト遺伝子および/またはヒト化された動物遺伝子を相同的組換えによって挿入すること、野生型または変異型または人工のプロモーターエレメントを使用するゲノムcDNA構築物またはミニ遺伝子cDNA構築物として変異型(1つの変異または多数の変異)のヒト遺伝子を挿入すること、あるいは内因性遺伝子の人工的に改変されたフラグメントを相同的組換えによって挿入することが含まれるが、これらに限定されない。これらの改変には、変異させた停止コドンの挿入、DNA配列の欠失、またはCreリコンビナーゼなどの酵素によって認識される組換えエレメント(loxp部位)を含ませることが含まれる。

40

【0085】

好ましい遺伝子組換えマウスまたは遺伝子標的化(ノックイン)マウスを作製するために、ナトリウムチャンネル β -1サブユニットの変異型形態を、卵母細胞への顕微注入の標準的な技術を使用してマウスの生殖系列に挿入することができる。あるいは、内因性のナトリウムチャンネル β -1サブユニット遺伝子を不活性化または置換することが所望されるならば、胚幹細胞を使用する相同的組換えを適用することができる。

【0086】

50

卵母細胞への注入の場合、1コピー以上の変異型ナトリウムチャンネル β -1サブユニット遺伝子を受精直後のマウス卵母細胞の前核に挿入することができる。その後、この卵母細胞は偽妊娠の養育親に再び移植される。生きて生まれたマウスは、その後、特定のヒトサブユニット遺伝子配列の存在に対する尾のDNAまたは他の組織に由来するDNAの分析を使用して、組み込まれた遺伝子についてスクリーニングすることができる。導入遺伝子は、YAC、BAC、PACまたは他の染色体DNAフラグメントとして注入される完全なゲノム配列、天然のプロモーターもしくは異種のプロモーターのいずれかを有する完全なcDNA、またはコード領域のすべてと、最適な発現のために必要であることが見出されている他のエレメントとを含有するミニ遺伝子のいずれかであり得る。

【0087】

10

本発明のさらに別の局面により、候補の薬学的化合物のスクリーニングについて上記に記載されるような、遺伝子改変された非ヒト動物の使用が提供される（上記薬物スクリーニングを参照のこと）。これらの動物はまた、てんかん、および／またはナトリウムチャンネルの機能不全と関連する他の障害を処置するための、上記に記載されるように本発明から同定される化合物を含む様々な候補薬学的化合物の評価（例えば、治療効力、毒性、代謝）のためにも有用である。

【0088】

多数の先行技術刊行物が本明細書中では参照されているが、この参照は、オーストラリアまたは任意の他の国において、これらの文書のいずれかがこの分野における共通する一般的な知識の一部を形成することを認めるものでないことが理解されることは明らかなこと

20

【0089】

本明細書および請求項の全体を通して、用語「含む（“comprise”、“comprises”および“comprising”）」は、文脈により他のことが要求される場合を除き、非排他的な意味で使用されている。

図面の簡単な説明

図1は、R85C変異を含有する家系に対するGEFS+系図を示す。この変異を含有する個体が示されている。最初の発端者には、Pとして印が付けられている。

図2は、本研究で同定されたSCN1B変異の配列決定軌跡図を示す。罹患個体に対する配列決定軌跡図が、C→Tのヌクレオチド変化を示す上段パネルにより表され、一方、下段パネルには、正常者の配列決定軌跡図が示される。

30

図3は、SCN1B変異の周囲のナトリウムチャンネルアミノ酸アラインメントを示す。85位におけるSCN1Bの非常に保存されたアルギニンアミノ酸は四角で囲まれている。このアミノ酸は、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーのメンバーでは多く保存されているが、他のSCNBサブユニットでは保存されていない。

【0090】

発明を実施するための態様

実施例1

罹患家系メンバーの臨床診断

3世代にわたる4名の家系メンバーからなる一群が、熱性発作プラスである全身性てんかん（GEFS+）の表現型が存在するために調べられた（系図については図1を参照のこと）。

40

【0091】

発端者（P）が日常的な臨床業務から確認された。この発端者には、1人の一親等の罹患患者および多数の二親等の罹患患者がいる。これまでに研究されたこれらの家系メンバーにおいて、すべての罹患患者がFS+の表現型を有し、そしてまれに起こる（5～10の範囲）の熱性発作および無熱性の強直間代性発作が15ヶ月～2歳の間で始まったが、2名の年長の罹患患者では、中期小児期および13歳以降早い時期までにそれぞれ止んだ。全員が知的には正常であり、他の点でも健康である。拡大された家系には、その表現型がGEFS+と一致する非常に多数の他の個体（約13名）が存在することが知られている。この

50

家系には近親婚関係者は知られていない。

【0092】

実施例 2

SCN1Bの変異研究

一本鎖高次構造多型 (SSCP) 分析および配列決定を、疾患の原因となる変異を同定するためにGEFS+の罹患者に対して行った。

【0093】

SSCPのために使用されたプライマーはその5'末端がHEXで標識された。プライマーは、SCN1Bの各エキソンの増幅を可能にするために、隣接するSCN1Bイントロン内において設計された (表1および配列番号3~12)。典型的なPCR反応が、30 ngの患者DNAを使用して10 μ lの総容量で行われた。PCR反応は、1回の処理サイズに依存して96ウェルプレートまたは0.5mlチューブで行われた。PCR反応液には、67mMのTris-HCl (pH 8.8); 16.5mMの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 6.5 μ MのEDTA; 1.5mMの MgCl_2 ; 200 μ Mの各dNTP; 10%のDMSO; 0.17mg/mlのBSA; 10mMの β -メルカプトエタノール; 15 μ g/mlの各プライマーおよび100U/mlのTaq DNAポリメラーゼが含まれた。第1エキソン、第2エキソン、第4エキソンおよび第5エキソンについては、PCR反応が、94℃で30秒間、60℃で30秒間、そして72℃で30秒間の10サイクル、それに続く、94℃で30秒間、55℃で30秒間、そして72℃で30秒間の25サイクルを使用して行われた。72℃で10分間の最後の伸長反応がその後に行われた。第3エキソンについては、PCR反応が、94℃で30秒間、62℃で30秒間、そして72℃で30秒間の35サイクルを、72℃で10分間の最後の伸長反応とともに使用して行われた。50% (v/v) のホルムアミド、12.5mMのEDTAおよび0.02% (w/v) のプロモフェノールブルーを含む20 μ lの負荷用色素を完了した反応液に加え、続いて、反応液を、架橋比が35:1 (アクリルアミド:ビス-アクリルアミド) である、2%のグリセロールを含有する非変性の4%ポリアクリルアミドゲルで泳動した。ゲルの厚さは100 μ mであり、幅が168mmで、長さが160mmであった。ゲルを、Gel Scan 2000システム (Corbett Research、オーストラリア) を製造者の説明書に従って使用して、周囲温度において、1200ボルトおよび約20 mAで泳動した。続いて、結果を、ONE-Scanゲル分析ソフトウェアパッケージ (Scanalytics Inc.) を使用して分析した。

【0094】

高次構造の変化を示したPCR産物を続いて配列決定した。これには、最初に、5' HEXの付加を有しないプライマーを使用して関連するアンプリコンを再増幅し、その後、配列決定用のPCR増幅テンプレートを、製造者の手順に基づいてQiaQuick PCRプレップ (Qiagen) を使用して精製することが伴った。精製されたSCN1Bアンプリコンを配列決定するために使用されたプライマーは、最初の増幅工程のために使用されたプライマーと同一であった。それぞれの配列決定反応について、25 ngのプライマーおよび100 ngの精製されたPCRテンプレートが使用された。BigDye配列決定キット (ABI) が、すべての配列決定反応のために、製造者の説明書に従って使用された。生成物はABI 377シーケンサーで泳動され、Edit Viewプログラムを使用して分析された。

【0095】

合計で53名の非関連のGEFS+患者が、蛍光SSCP分析および配列決定によってスクリーニングされた。調べられた17名の特発性GEFS+症例では変異が見出されなかった。調べられた36家系のうち、3つの家系が点変異をSCN1Aに有することが見出され (Wallace他、2001)、2つの家系がC121W変異をSCN1Bに含有することが見出され (Wallace他、1998)、1つの家系 (図1) に、配列番号1によって表されるような253位におけるCからTへのヌクレオチド変異による第3エキソン内の新規なSCN1B変異が同定された。このヌクレオチド変化は、配列番号2に

よって表されるようなコードされるタンパク質の 85 位においてアルギニンアミノ酸残基のシステイン残基への置換をもたらしている。これらの変化はいずれも、コントロール集団には存在しなかった。

【表 1】

表 1

SCN1B の SSCP 分析のために使用されたプライマー

エキソン	フォワード	リバース	サイズ (bp)
1	CGCCTCTCGCCCCGCTATTA	CTCCCGCCGCCCCGCCGTG	169
2	CCTGACCTGAGCCTGCTGTC	TGCCCTCCCATGCCGTTAA	228
3	CCTTCCCCTCCCTGGCTAC	GGCAGGCAGCACCCGACTCA	285
4	CAGCCTGGGCTACCCCTTA	CCCTGGGTGCCCTCCCACCT	220
5	CGGTCTGATGATGGGGTCAC	TTACGGCTGGCTCTTCCTTG	243

10

20

【0096】

実施例 3

新規な SCN1B 変異の特徴づけ

本発明の C から T へのヌクレオチド変化は C f o I 制限酵素部位の破壊をもたらす。これにより、この変異を含有する個体におけるてんかんを診断するための手段が提供される。例えば、試験される個体から得られた DNA を、第 3 エキシソンの S S C P 分析において使用されたようなプライマー（配列番号 7 および 8）を用いて増幅することができる。得られる増幅 DNA を続いて精製し、そして制限酵素 C f o I で消化することができる。C から T へのヌクレオチド変化を含有する増幅物はこの酵素によって消化されず、これに対し

30

【0097】

C 1 2 1 W および R 8 5 C の両方の S C N 1 B 変異において、アミノ酸の置換がタンパク質の細胞外のアミノ末端ドメインに生じている。電位依存性ナトリウムチャンネル β サブユニット ($\beta - 1$ 、 $\beta - 2$) は、1 つの膜貫通領域と、突出した細胞外アミノ末端ドメインとを有する内在性膜タンパク質である。組換えナトリウムチャンネル $\beta - 1$ サブユニットは、ゲート開閉挙動および様々な α サブユニット（脳のイソ型を含む）の発現レベルに対する著しい調節作用を発揮することが明らかにされている (I s o m 他、1992; M a k i t a 他、1994)。ゲート開閉調節に対する $\beta - 1$ サブユニットの機能的作用は、細胞外ドメインに主に存在する様々な構造に依存している (M c C o r m i c k 他、1998; M a k i t a 他、1996)。細胞外ドメインには、神経細胞接着分子（コンタクチン）の対応する領域に対して、また免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーの他のメンバーの対応する領域に対して大きな程度のアミノ酸類似性を有する 1 つの免疫グロブリン様折り畳みモチーフが含まれる (I s o m 他、1995; M c C o r m i c k 他、1998)。このモチーフは、S C N 1 B 内の C y s 1 2 1 を含む 2 つの非常に保存されたシステイン残基の間における 1 つの推定されるジスルフィド架橋によって構造的に維持されている。従って、C 1 2 1 W 変異は、細胞外ドメインの二次構造を変化させ得るジスルフィド架橋の破壊をもたらしていると考えられる。興味深いことに、本発明の好ましい実施形態を構成する新規な S C N 1 B 変異 (R 8 5 C) により、アルギニン残基がシステイ

40

50

ン残基で置換される。このシステイン残基の存在は、正常なジスルフィド架橋の形成または未だ明らかにされていない他の機構を妨げることによってイオンチャンネルの機能発現に影響を及ぼし得る。

【0098】

現在、G E F S + の遺伝的不均一性が広く明らかにされている。53名の患者からなるパネルにおけるS C N 1 BおよびS C N 1 Aのスクリーニングは、17名の孤立型G E S F + 症例では変異が全く見出されなかったことを示している。しかし、残る36名の家族性症例でのこれらの遺伝子のそれぞれにおけるG E F S + 発生変異の頻度は約17% (6/36) 以下であった。これらの2つのナトリウムチャンネル遺伝子によって引き起こされるG E F S + 症例の割合が低いことは、他の遺伝子が関与していることを示している。明かな候補には、ニューロンの他のナトリウムチャンネル、およびナトリウムチャンネルと相互作用するタンパク質が含まれる。S C N 1 Bが、熱性発作に対する原因であると考えられる多くの遺伝子の1つであることが確認されたことにより、より大きな診断精度、より正確な遺伝子カウンセリング、そして熱性発作および全身性てんかんを処置するためのより合理的な根拠が可能になる。

10

【0099】

実施例4

変異型S C N 1 Bサブユニットおよびこれを含むナトリウムチャンネルの分析

下記の方法が、変異型S C N 1 Bサブユニットおよびこれを含むナトリウムチャンネルの構造および機能を明らかにするために使用される。

20

【0100】

分子生物学的研究

全体として、または個々の変異型 β -1サブユニットを介して本発明の変異型ナトリウムチャンネルが既知のタンパク質および未知のタンパク質と結合する能力を調べることができる。酵母ツーハイブリッドシステムなどの手法が、何らかの機能的パートナーを発見し、同定するために使用される。酵母ツーハイブリッド法の基となる原理は、真核生物の多くの転写活性化因子は、酵母における転写活性化因子を含めて、2つの異なるモジュール状ドメインからなるということである。1つが、特定のプロモーター配列に結合するDNA結合ドメインであり、もう1つが、DNA結合部位の下流にある遺伝子をRNAポリメラーゼII複合体に転写させる活性化ドメインである。いずれのドメインも単独で転写を活性化することができないので、両方のドメインが転写活性化のためには必要である。酵母ツーハイブリッド法では、目的とする遺伝子またはその一部（えさ）が、DNA結合ドメインを有するペプチドに対する融合体として発現されるような様式でクローン化される。別の遺伝子または多数の遺伝子（cDNAライブラリーに由来する遺伝子など）（標的）が、活性化ドメインに対する融合体として発現されるようにクローン化される。目的とするタンパク質がその結合パートナーと相互作用することにより、DNA結合性のペプチドが活性化ドメインと一緒に、レポーター遺伝子の転写が開始される。第1のレポーター遺伝子により、相互作用するタンパク質を含有する酵母細胞が選択される（このレポーターは、通常、選択培地における増殖のために要求される栄養学的遺伝子である）。第2のレポーターが確認のために使用される。これは、相互作用するタンパク質に応答して発現するが、通常、生育のためには要求されない。

30

40

【0101】

ナトリウムチャンネルと相互作用する遺伝子およびタンパク質の性質もまた、これらのパートナーがまた薬物発見のための標的とすることができるようになるように調べることができる。

【0102】

構造研究

本発明のS C N 1 B組換えタンパク質は、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞および／または哺乳動物細胞において産生させることができ、そして結晶学研究およびNMR研究において使用することができる。タンパク質の分子モデル化ならびにこれらを含むナトリウムチャンネルのモデル化と一緒にすることにより、構造に基づく薬物設計を容易にすることが

50

できる。

【0103】

実施例 5

ポリクローナル抗体の作製

抗体を、変異型 S C N 1 B タンパク質と選択的に結合させ、そして変異型 S C N 1 B タンパク質を野生型タンパク質から区別するために作製することができる。変異誘発を受けたエピトープに対して特異的な抗体は、薬学的薬剤の治療的可能性を評価するために薬学的薬剤で処理されている細胞についてスクリーニングするための細胞培養アッセイにおいて特に有用である。

【0104】

ポリクローナル抗体を調製するために、S C N 1 B のアミノ酸配列に対して相同的な短いペプチドを設計することができる。そのようなペプチドは、典型的には、長さが 10 アミノ酸～15 アミノ酸である。これらのペプチドは、他の受容体サブユニットに対する相同性が最も小さい領域において設計されるべきであり、そしてまた、モノクローナル抗体製造などのさらなる下流側の実験における種間の相互作用を避けるために、マウスのオルソログに対する相同性が悪くならない。その後、合成ペプチドを、P I E R C E^T_M キット (P I E R C E) などの市販のキットとともに提供される標準的なプロトコルを使用してビオチン (スルホ-NH S-L C ビオチン) にコンジュゲート化することができる。続いて、ビオチン化ペプチドは溶液中でアビジンと複合体化され、そしてそれぞれのペプチド複合体について、2羽のウサギが、投与と投与との間に3週間の間隔で4回の抗原投与 (200 μg / 投与) で免疫化される。最初の投与物はフロイント完全アジュバントと混合され、一方、その後の投与物はフロイント免疫アジュバントと一緒にされる。免疫化が完了した後、ウサギは試験採血され、血清の反応性が、元のペプチドの連続希釈物を用いたドットプロットによってアッセイされる。ウサギが、免疫化前の血清と比較して著しい反応性を示す場合、免疫血清がさらなる実験のために分離され得るように、ウサギは屠殺され、血液が集められる。

【0105】

変異型 β-1 サブユニットに対する抗体は、様々な組織における変異型形態の存在および相対的レベルを検出するために使用することができる。

【0106】

実施例 6

モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体を下記の様式で調製することができる。完全な変異型 S C N 1 B サブユニットタンパク質または変異型 S C N 1 B サブユニットペプチドを含む免疫原がフロイントアジュバントにおいてマウスに注射される、この場合、それぞれのマウスには、10 μg ~ 100 μg の免疫原の4回の注射が施される。4回目の注射の後、マウスから採取された血液サンプルが、免疫原に対する抗体の存在について調べられる。免疫マウスは屠殺され、その脾臓が摘出され、単一細胞懸濁物が調製される (H a r l o w および L a n e、1988)。脾臓細胞はリンパ球の供給源として役立ち、リンパ球は、その後、永久的に生育するミエロマパートナー細胞と融合される (K o h l e r および M i l l s t e i n、1975)。細胞は96 ウェルプレートに 2×10^5 細胞 / ウェルの密度で置床され、個々のウェルが生育について調べられる。これらのウェルは、その後、野生型または変異型のサブユニット標的タンパク質を使用する E L I S A または R I A によって G A B A 受容体サブユニット特異的抗体の存在について試験される。陽性ウェルの細胞は拡大培養され、そしてモノクローナル性を明らかにし、かつ確認するためにサブクローン化される。所望する特異性を有するクローンを拡大培養し、マウスにおける腹水物として増殖させ、その後、プロテイン A セファロースを使用するアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーまたはこれらの技術の変法および組合せを使用した精製が行われる。

【0107】

参考文献：

本明細書中に引用された参考文献は以下の頁に挙げられており、この引用により本明細書に組み込まれている。

- Alekov, AK. et al. (2000). *J Physiol.* 529: 533-539.
- Annegers, JF. (1996). *The treatment of epilepsy: Principles and practice*. Second Edition. (Wyllie E (Ed) Williams and Wilkins). 10
- Baulac, S. et al. (1999). *Am. J. Hum. Genet.* 65: 1078-1085.
- Berkovic, SF. et al. (1987). *Neurology* 37: 993-1000.
- Berkovic, SF. Et al. (1994). *The epilepsies: specific syndromes or a neurobiological continuum?* In: *Epileptic seizures and syndromes* (Wolf (Ed) London: John Liddey). 25-37.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. (1989). *Epilepsia.* 30: 389-399. 20
- Escayg, A. et al. (2000). *Nature Genet.* 24: 343-345.
- Gardiner, M. (2000). *J Neurol.* 247: 327-334.
- Gonzalez, JE. et al. (1999). *Drug Discov. Today* 4: 431-439.
- Hamill, OP. et al. (1981). *Pflugers Arch.* 391: 85-100.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). 30
- Huse, WD. et al. (1989). *Science* 246: 1275-1281.
- Isom, LL. et al. (1992). *Science* 256: 839-842.
- Isom, LL. et al. (1995). *Cell* 83: 433-442.
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975). *Nature* 256: 495-497.
- Lopes-Cendes, I. et al. (2000). *Am. J. Hum. Genet.* 66: 698-701. 40
- Makita, N. et al. (1994). *J. Biol. Chem.* 269: 7571-7578.
- Makita N. et al. (1996). *J. Neurosci.* 16: 7117-7127.
- McCormick, KA. et al. (1998). *J. Biol. Chem.* 273: 3954-3962.
- Moulard, B. et al. (1999). *Am. J. Hum. Genet.* 65: 1396-

1400.

Peiffer, A. et al. (1999). *Ann. Neurol.* 46: 671-678.

Reutens, DC. and Berkovic, SF. (1995). *Neurology* 45: 1469-1476.

Roger, J. et al. (1992). *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*. Second Edition. (John Libbey, London).

Scheffer, IE. et al. (2000). *Ann. Neurol.* 47: 840-841.

10

Scheffer, IE. and Berkovic, SF. (1997). *Brain* 120 : 479-490.

Singh, R. et al. (1999). *Ann Neurol.* 45: 75-81.

Sutton, GC. (1990). *The principles and practice of medical genetics*. Second Edition. (Churchill Livingstone, NY).

Wallace, RH. et al. (2001). *Am. J. Hum. Genet.* 68: 859-865.

Wallace, RH. et al. (1998). *Nature Genet.* 19: 366-370.

20

【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
14 November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/090532 A1

- (51) International Patent Classification: C12N 15/00
- (21) International Application Number: PCT/AU02/00581
- (22) International Filing Date: 9 May 2002 (09.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: PR 4922 10 May 2001 (10.05.2001) AU
- (71) Applicant (for all designated States except US): **BIO-NOMICS LIMITED** [AU/AU]; 31 Dalgleish Street, Thebarton, South Australia 5031 (AU).
- (72) Inventors; and
(73) Inventors/Applicants (for US only): **MULLEY, John, Charles** [AU/AU]; 13 Dunkley Avenue, Firlie, South Australia 5046 (AU); **WALLACE, Robyn, Heather** [AU/US]; 70 South Fourth Street, Apartment #25, Memphis, TN 38103 (US); **SCHNEIDER, Ingrid, Eileen** [AU/AU]; 20 Central Park Road, Malvern East, Victoria 3145 (AU).
- (74) Agent: **GRIFFITH HACK**; 10/167 Eagle Street, G.P.O. Box 3125, Brisbane, Queensland 4000 (AU).
- (81) Designated States (national): AI, 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, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, 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, HU, 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
— entirely in electronic form (except for this front page) 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 02/090532 A1

(54) Title: NOVEL MUTATION

(57) Abstract: An isolated nucleic acid molecule encoding a mutant mammalian beta-1 subunit of a voltage-gated sodium channel wherein a mutation event has occurred and said mutation event disrupts the functioning of an assembled sodium channel so as to produce an epilepsy phenotype, with the proviso that said mutation event is not one which results in a C121W substitution in the encoded polypeptide.

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 1 -

NOVEL MUTATIONTechnical Field

5 The present invention is concerned with a new mutation in the SCN1B gene that is involved in epilepsy and, more particularly, with a new SCN1B gene mutation associated with generalised epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+).

10 Background Art

Epilepsies constitute a diverse collection of brain disorders that affect about 3% of the population at some time in their lives (Annegers, 1996). An epileptic seizure can be defined as an episodic change in behaviour caused by the disordered firing of populations of neurons in the central nervous system. This results in varying degrees of involuntary muscle contraction and often a loss of consciousness. Epilepsy syndromes have been classified into more than 40 distinct types based upon characteristic symptoms, types of seizure, cause, age of onset and EEG patterns (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1989). However the single feature that is common to all syndromes is the persistent increase in neuronal excitability that is both occasionally and unpredictably expressed as a seizure.

25 A genetic contribution to the aetiology of epilepsy has been estimated to be present in approximately 40% of affected individuals (Gardiner, 2000). As epileptic seizures may be the end-point of a number of molecular aberrations that ultimately disturb neuronal synchrony, the genetic basis for epilepsy is likely to be heterogeneous. There are over 200 Mendelian diseases which include epilepsy as part of the phenotype. In these diseases, seizures are symptomatic of underlying neurological involvement such as disturbances in brain structure or function. In contrast, there are also a number of "pure" epilepsy syndromes in which epilepsy is

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 2 -

the sole manifestation in the affected individuals. These are termed idiopathic and account for over 60% of all epilepsy cases.

Idiopathic epilepsies have been further divided into partial and generalized sub-types. Partial (focal or local) epileptic fits arise from localized cortical discharges, so that only certain groups of muscles are involved and consciousness may be retained (Sutton, 1990). However, in generalized epilepsy, EEG discharge shows no focus such that all subcortical regions of the brain are involved. Although the observation that generalized epilepsies are frequently inherited is understandable, the mechanism by which genetic defects, presumably expressed constitutively in the brain, give rise to partial seizures is less clear.

The idiopathic generalized epilepsies (IGE) are the most common group of inherited human epilepsies. Two broad groups of IGE are now known - the classical idiopathic generalized epilepsies (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1989) and the newly recognized genetic syndrome of generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) (Scheffer and Berkovic, 1997; Singh et al. 1999). The classical IGEs are divided into a number of clinically recognizable but overlapping sub-syndromes including childhood absence epilepsy (CAE), juvenile absence epilepsy, juvenile myoclonic epilepsy etc (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1989; Roger et al. 1992). The sub-syndromes are identified by age of onset and the pattern of seizure types (absence, myoclonus and tonic-clonic). Some patients, particularly those with tonic-clonic seizures alone do not fit a specifically recognized sub-syndrome. Arguments for regarding these as separate syndromes, yet recognizing that they are part of a neurobiological continuum, have been presented previously (Berkovic et al. 1987; 1994; Reutens and Berkovic, 1995).

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 4 -

are located in highly conserved S4 transmembrane segments of the channel which are known to have a role in channel gating. Functional studies of the R1648H mutation in the same conserved region of SCN4A (R1460H) have shown that the time-course of inactivation of the mutant channels is slightly slowed and the recovery from inactivation is accelerated when compared to wild-type channels (Alekov et al. 2000). A combination of the subtle changes in activation and fast inactivation are therefore sufficient to cause epilepsy. GEFS+ is clearly a common complex disorder, with a strong genetic basis, incomplete penetrance and genetic and phenotypic heterogeneity. Febrile seizures occur in 3% of the population, and thus this phenotype may occur sporadically in GEFS+ families, in addition to occurring as a result of the GEFS+ gene (Wallace et al 1998). Also, although some families segregate an autosomal dominant gene of major effect, in many cases clinical genetic evidence, such as bilineality, suggests that for some small families the disorder is multifactorial (Singh et al 1999).

Despite the rarity of SCN1A and SCN1B mutations in GEFS+, a novel mutation in the SCN1B gene has been identified in affected families. The frequency of involvement of the SCN1 genes in epilepsy may therefore be greater than first thought.

Disclosure of the Invention

The present inventors have identified a novel mutation in the beta-1 subunit (SCN1B) of the voltage-gated sodium channel that is associated with epilepsy, in particular generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+).

In one embodiment, the present invention provides an isolated mammalian nucleic acid molecule encoding a mutant beta-1 subunit of a voltage-gated sodium channel wherein a mutation event has occurred and said mutation event disrupts the functioning of an assembled sodium channel so

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 3 -

Generalised epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+; MIM 604236) was first described in 1997 (Scheffer & Berkovic, 1997) and is now recognised as a common epilepsy syndrome (Singh et al. 1999; Baulac et al. 1999; Peiffer et al. 1999; Scheffer et al. 2000). Although GEFS+ is familial, it was initially difficult to recognise it as a distinct syndrome due to clinical heterogeneity within each family. The common phenotypes are typical febrile seizures and febrile seizures plus (FS+); FS+ differs from typical febrile seizures in that the attacks with fever continue beyond 6 years and/or include afebrile tonic-clonic seizures. Less common phenotypes include FS+ associated with absences, myoclonic seizures or atonic seizures and even more severe syndromes such as myoclonic-astatic epilepsy. That such phenotypic diversity could be associated with the segregation of a mutation in a single gene was established with the identification of a mutation in the voltage-gated sodium channel beta-1 subunit gene (SCN1B) (Wallace et al. 1998). The mutation (C121W) changes a conserved cysteine residue, disrupting a putative disulfide bridge with in vitro loss of function of the SCN1B subunit. Without a functional SCN1B subunit the rate of inactivation of sodium channel alpha subunits decreases, which may cause increased sodium influx, resulting in a more depolarised membrane potential and hyperexcitability.

In additional studies, four GEFS+ families were mapped to chromosome 2q (Baulac et al. 1999; Moulard et al. 1999; Peiffer et al. 1999; Lopes-Cendes et al. 2000). Recently, mutations in the neuronal voltage gated sodium channel alpha-1 (SCN1A) subunit which maps to chromosome 2q were described in GEFS+ families (Wallace et al. 2001). The mutations (D188V, V1353L and I1656M) are all located in highly conserved residues situated adjacent or within the membrane spanning segments of the subunit. Mutations in SCN1A have also been identified in additional families (Escayg et al. 2000). These mutations (T875M and R1648H)

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 5 -

as to produce an epilepsy phenotype, with the proviso that said mutation event is not one which results in a C121W substitution in the encoded polypeptide. In particular, the mutation lies in the extracellular loop of the amino
5 terminal domain of SCN1B at amino acid position 85.

In one form of the invention, the mutation is in exon 3 of SCN1B and results in the replacement of an arginine residue with a cysteine residue at amino acid position 85. The R85C mutation occurs as a result of a C to T
10 nucleotide substitution at position 253 of the SCN1B coding sequence as illustrated in SEQ ID NO: 1. Preferably the mutation creates a phenotype of generalized epilepsy with febrile seizures plus.

The nucleotide sequences of the present invention can be engineered using methods accepted in the art for a variety of purposes. These include, but are not limited to, modification of the cloning, processing, and/or expression of the gene product. PCR reassembly of gene fragments and the use of synthetic oligonucleotides allow
20 the engineering of the nucleotide sequences of the present invention. For example, oligonucleotide-mediated site-directed mutagenesis can introduce further mutations that create new restriction sites, alter expression patterns and produce splice variants etc.

As a result of the degeneracy of the genetic code, a number of polynucleotide sequences, some that may have minimal similarity to the polynucleotide sequences of any known and naturally occurring gene, may be produced. Thus, the invention includes each and every possible variation
30 of a polynucleotide sequence that could be made by selecting combinations based on possible codon choices. These combinations are made in accordance with the standard triplet genetic code as applied to the polynucleotide sequences of the present invention, and all
35 such variations are to be considered as being specifically disclosed.

The DNA molecules of this invention include cDNA,

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 6 -

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 derivatised nucleotide bases as will be appreciated by those skilled in the art. Such modifications include labels, methylation, intercalators, alkylators and modified linkages. In some instances it may be advantageous to produce nucleotide sequences possessing a substantially different codon usage than that of the polynucleotide sequences of the present invention. For example, codons may be selected to increase the rate of expression of the peptide in a particular prokaryotic or eukaryotic host corresponding with the frequency that particular codons are utilized by the host. Other reasons to alter the nucleotide sequence without altering the encoded amino acid sequences include the production of RNA transcripts having more desirable properties, such as a greater half-life, than transcripts produced from the naturally occurring mutated sequence.

The invention also encompasses production of DNA sequences of the present invention entirely by synthetic chemistry. Synthetic sequences may be inserted into expression vectors and cell systems that contain the necessary elements for transcriptional and translational control of the inserted coding sequence in a suitable host. These elements may include regulatory sequences, promoters, 5' and 3' untranslated regions and specific initiation signals (such as an ATG initiation codon and Kozak consensus sequence) which allow more efficient translation of sequences encoding the polypeptides of the present invention. In cases where the complete coding sequence, including the initiation codon and upstream regulatory sequences, are inserted into the appropriate expression vector, additional control signals may not be needed. However, in cases where only coding sequence, or a fragment thereof, is inserted, exogenous translational control signals as described above should be provided by

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 7 -

the vector. Such signals may be of various origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of enhancers appropriate for the particular host cell system used (Scharf et al., 1994).

5 The invention also includes nucleic acid molecules that are the complements of the sequences described herein.

The present invention allows for the preparation of purified polypeptides or proteins from the polynucleotides of the present invention, or variants thereof. In order to do this, host cells may be transformed with a DNA molecule as described above. Typically said host cells are transfected with an expression vector comprising a DNA molecule according to the invention. A variety of expression vector/host systems may be utilized to contain and express sequences encoding polypeptides of the invention. These include, but are not limited to, microorganisms such as bacteria transformed with plasmid or cosmid DNA expression vectors; yeast transformed with yeast expression vectors; insect cell systems infected with viral expression vectors (e.g., baculovirus); or mouse or other animal or human tissue cell systems. Mammalian cells can be used to express a protein using various expression vectors including plasmid, cosmid and viral systems such as a vaccinia virus expression system. The invention is not limited by the host cell employed.

The polynucleotide sequences, or variants thereof, of the present invention can be stably expressed in cell lines to allow long term production of recombinant proteins in mammalian systems. Sequences encoding the polypeptides of the present invention can be transformed into cell lines using expression vectors which may contain viral origins of replication and/or endogenous expression elements and a selectable marker gene on the same or on a separate vector. The selectable marker confers resistance to a selective agent, and its presence allows growth and recovery of cells which successfully express the

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 8 -

introduced sequences. Resistant clones of stably transformed cells may be propagated using tissue culture techniques appropriate to the cell type.

5 The protein produced by a transformed cell may be secreted or retained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing polynucleotides which encode a protein may be designed to contain signal sequences which direct secretion of the protein through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane.

10 In addition, a host cell strain may be chosen for its ability to modulate expression of the inserted sequences or to process the expressed protein in the desired fashion. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, glycosylation, phosphorylation, and acylation. Post-translational cleavage of a "prepro" form of the protein may also be used to specify protein targeting, folding, and/or activity. Different host cells having specific cellular machinery and characteristic mechanisms for post-translational activities (e.g., CHO or HeLa cells), are available from the American Type Culture Collection (ATCC) and may be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein.

25 When large quantities of the gene are needed, such as for antibody production, vectors which direct high levels of expression of this protein may be used, such as those containing the T5 or T7 inducible bacteriophage promoter. The present invention also includes the use of the expression systems described above in generating and isolating fusion proteins which contain important functional domains of the protein. These fusion proteins are used for binding, structural and functional studies as well as for the generation of appropriate antibodies.

30 In order to express and purify the protein as a fusion protein, the appropriate polynucleotide sequences of the present invention are inserted into a vector which

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 9 -

contains a nucleotide sequence encoding another peptide (for example, glutathione-s-transferase). The fusion protein is expressed and recovered from prokaryotic or eukaryotic cells. The fusion protein can then be purified by affinity chromatography based upon the fusion vector sequence. The desired protein is then obtained by enzymatic cleavage of the fusion protein.

Fragments of polypeptides of the present invention may also be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques. Automated synthesis may be achieved by using the ABI 431A Peptide Synthesizer (Perkin-Elmer). Various fragments of this protein may be synthesized separately and then combined to produce the full-length molecule.

According to still another aspect, the invention provides an isolated mammalian polypeptide, said polypeptide being a mutant beta-1 subunit of a voltage-gated sodium channel, wherein a mutation event has occurred and said mutation event disrupts the functioning of an assembled sodium channel so as to produce an epilepsy phenotype, with the proviso that said mutation event is not a C121W substitution. In particular, the mutation lies in the extracellular loop of the amino terminal domain of SCN1B at amino acid position 85.

In one form of the invention, the mutation event is a substitution in which an arginine residue is replaced with a cysteine residue at amino acid position 85 of the SCN1B protein as illustrated in SEQ ID NO: 2.

According to still another aspect of the invention, there is provided an isolated polypeptide complex, said polypeptide complex being an assembled mammalian voltage-gated sodium channel, wherein a mutation event has taken place in the beta-1 subunit and said mutation event disrupts the functioning of the assembled sodium channel. Preferably, there is a mutation at amino acid position 85 of the SCN1B subunit of the channel.

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 10 -

In a further aspect, the mutation is an R85C mutation in SCN1B.

According to another aspect of the present invention there is provided a method of preparing a polypeptide, said polypeptide being a mutant SCN1B subunit of a mammalian voltage-gated sodium channel, comprising the steps of:

(1) culturing host cells transfected with an expression vector comprising a nucleic acid molecule as described above under conditions effective for polypeptide production; and

(2) harvesting the mutant SCN1B subunit.

The mutant SCN1B subunit may also be allowed to assemble with other subunits of the sodium channel that may be co-expressed by the cell, whereby the assembled mutant sodium channel is harvested.

According to still another aspect of the invention there is provided a polypeptide which is the product of the process described above.

Substantially purified protein or fragments thereof can then be used in further biochemical analyses to establish secondary and tertiary structure for example by X-ray crystallography of crystals of the proteins or by nuclear magnetic resonance (NMR). Determination of structure allows for the rational design of pharmaceuticals to interact with the mutated sodium channel, alter the overall sodium channel protein charge configuration or charge interaction with other proteins, or to alter its function in the cell.

It will be appreciated that, having identified a new mutation involved in epilepsy in SCN1B, the mutant sodium channel beta-1 subunit of the present invention will enable therapeutic methods for the treatment of epilepsy including, but not restricted to, generalised epilepsy with febrile seizures plus as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction. The mutant SCN1B subunit of the present invention will also be useful

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 11 -

in diagnostic applications to screen for and detect the presence of the mutated gene or gene product in individuals affected by disorders as described above.

5 Therapeutic Applications

According to one aspect of the invention there is provided a method of treating epilepsy, as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction, comprising administering a selective antagonist, agonist
10 or modulator of the sodium channel when it contains a mutation as described above, more particularly, a mutation at amino acid position 85 of an SCN1B subunit comprising the channel.

In still another aspect of the invention there is provided the use of a selective antagonist, agonist or
15 modulator of the sodium channel when it contains a mutation as described above, more particularly, a mutation at amino acid position 85 of an SCN1B subunit comprising the channel, said mutation being causative of a disorder including epilepsy in the manufacture of a medicament for
20 the treatment of the disorder.

In one aspect of the invention a suitable agonist, antagonist or modulator will restore wild-type function to sodium channels containing SCN1B mutations that form part
25 of this invention or will negate the effects a mutant channel has on cell function.

Using methods well known in the art, a mutant sodium channel may be used to produce antibodies specific for the mutant channel that is causative of the disease or to
30 screen libraries of pharmaceutical agents to identify those that bind the mutant sodium channel.

In one aspect, an antibody, which specifically binds to a mutant sodium channel or mutant SCN1B subunit of the invention, may be used directly as an antagonist or
35 modulator, or indirectly as a targeting or delivery mechanism for bringing a pharmaceutical agent to cells or tissues that express the mutant sodium channel.

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 12 -

In a still further aspect of the invention there is provided an antibody which is immunologically reactive with a polypeptide as described above, but not with a wild-type sodium channel or SCN1B subunit thereof.

5 In particular, there is provided an antibody to an assembled sodium channel which contains an SCN1B subunit mutation of the invention that is causative of a disorder. Such antibodies may include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, and single chain
10 antibodies as would be understood by the person skilled in the art.

For the production of antibodies, various hosts including rabbits, rats, goats, mice, humans, and others may be immunized by injection with a polypeptide as
15 described or with any fragment or oligopeptide thereof which has immunogenic properties. Various adjuvants may be used to increase immunological response and include, but are not limited to, Freund's, mineral gels such as aluminum hydroxide, and surface-active substances such as
20 lysolecithin. Adjuvants used in humans include BCG (bacilli Calmette-Guerin) and Corynebacterium parvum.

It is preferred that the oligopeptides, peptides, or fragments used to induce antibodies to the mutant sodium channel have an amino acid sequence consisting of at least
25 5 amino acids, and, more preferably, of at least 10 amino acids. It is also preferable that these oligopeptides, peptides, or fragments are identical to a portion of the amino acid sequence of the natural protein and contain the entire amino acid sequence of a small, naturally occurring
30 molecule. Short stretches of sodium channel amino acids may be fused with those of another protein, such as KLH, and antibodies to the chimeric molecule may be produced.

Monoclonal antibodies to a mutant sodium channel may be prepared using any technique which provides for the
35 production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique,

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 13 -

and the EBV-hybridoma technique. (For example, see Kohler et al., 1975; Kozbor et al., 1985; Cote et al., 1983; Cole et al., 1984).

Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in the literature. (For example, see Orlandi et al., 1989; Winter et al., 1991).

Antibody fragments which contain specific binding sites for a mutant sodium channel may also be generated. For example, such fragments include, F(ab')₂ fragments produced by pepsin digestion of the antibody molecule and Fab fragments generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity. (For example, see Huse et al., 1989).

Various immunoassays may be used for screening to identify antibodies having the desired specificity. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays using either polyclonal or monoclonal antibodies with established specificities are well known in the art. Such immunoassays typically involve the measurement of complex formation between a sodium channel and its specific antibody. A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing antibodies reactive to two non-interfering sodium channel epitopes is preferred, but a competitive binding assay may also be employed.

In a further aspect of the invention there is provided a method of treating epilepsy, as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction, comprising administering an isolated DNA molecule which is the complement (antisense) of any one of the DNA molecules described above and which encodes an RNA molecule that hybridizes with the mRNA encoding a mutant sodium channel beta-1 subunit of the invention, to a subject in need of such treatment.

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 14 -

Typically, a vector expressing the complement of the polynucleotides of the invention may be administered to a subject in need of such treatment. Antisense strategies may use a variety of approaches including the use of antisense oligonucleotides, injection of antisense RNA, ribozymes, DNazymes and transfection of antisense RNA expression vectors. Many methods for introducing vectors into cells or tissues are available and equally suitable for use *in vivo*, *in vitro*, and *ex vivo*. For *ex vivo* therapy, vectors may be introduced into stem cells taken from the patient and clonally propagated for autologous transplant back into that same patient. Delivery by transfection, by liposome injections, or by polycationic amino polymers may be achieved using methods which are well known in the art. (For example, see Goldman *et al.*, 1997).

In a still further aspect of the invention there is provided the use of an isolated DNA molecule which is the complement of a DNA molecule of the invention and which encodes an RNA molecule that hybridizes with the mRNA encoding a mutant sodium channel beta-1 subunit of the invention, in the manufacture of a medicament for the treatment of epilepsy as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction.

In some instances, an appropriate approach for treatment may be combination therapy. This may involve the administering an antibody or complement to a mutant SCN1B subunit or sodium channel of the invention to inhibit its functional effect, combined with administration of wild-type SCN1B which may restore levels of wild-type sodium channel formation to normal levels. Wild-type SCN1B can be administered using gene therapy approaches as described above for complement administration.

There is therefore provided a method of treating epilepsy as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction comprising administration of an antibody or complement to a mutant SCN1B subunit or sodium

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 15 -

channel of the invention in combination with administration of wild-type SCN1B.

5 In still another aspect of the invention there is provided the use of an antibody or complement to a mutant SCN1B subunit or sodium channel of the invention in combination with the use of wild-type SCN1B, in the manufacture of a medicament for the treatment of epilepsy as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction.

10 In a further aspect, a suitable agonist or modulator may include peptides, phosphopeptides or small organic or inorganic compounds that can restore wild-type activity of the sodium channel containing mutations in the beta-1 subunit as described above.

15 Peptides, phosphopeptides or small organic or inorganic compounds suitable for therapeutic applications may be identified using nucleic acids and peptides of the invention in drug screening applications as described below. Molecules identified from these screens may also be of therapeutic application in affected individuals carrying other sodium channel gene mutations, or individuals carrying mutations in genes other than sodium channels, if the molecule is able to correct the common underlying functional deficit imposed by these mutations and those of the invention.

20 There is therefore provided a method of treating epilepsy, as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction, in individuals with sodium channel mutations or individuals carrying mutations in genes other than sodium channels, comprising administering a compound that is a suitable agonist or modulator of a sodium channel and that has been identified using the mutant sodium channel subunits of the invention.

25 In further embodiments, any of the agonists, antagonists, modulators, antibodies, complementary sequences or vectors of the invention may be administered alone or in combination with other appropriate therapeutic

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 16 -

agents. Selection of the appropriate agents may be made by those skilled in the art, according to conventional pharmaceutical principles. The combination of therapeutic agents may act synergistically to effect the treatment or prevention of epilepsy. Using this approach, therapeutic efficacy with lower dosages of each agent may be possible, thus reducing the potential for adverse side effects.

Any of the therapeutic methods described above may be applied to any subject in need of such therapy, including, for example, mammals such as dogs, cats, cows, horses, rabbits, monkeys, and most preferably, humans.

Drug screening

According to still another aspect of the invention, peptides of the invention, particularly purified mutant sodium channel beta-1 subunit polypeptide and cells expressing these, are useful for the screening of candidate pharmaceutical compounds in a variety of assays.

Still further, it provides the use of a polypeptide or a polypeptide complex for the screening of candidate pharmaceutical agents.

Still further, it provides the use wherein high throughput screening techniques are employed.

Compounds that can be screened in accordance with the invention include, but are not limited to peptides (such as soluble peptides), phosphopeptides and small organic or inorganic molecules (such as natural product or synthetic chemical libraries and peptidomimetics).

In one embodiment, a screening assay may include a cell-based assay utilising eukaryotic or prokaryotic host cells that are stably transformed with recombinant molecules expressing the polypeptides or fragments of the invention, in competitive binding assays. Binding assays will measure the formation of complexes between a mutated sodium channel beta-1 subunit polypeptide or fragment and the compound being tested, or will measure the degree to which a compound being tested will interfere with the

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 17 -

formation of a complex between a mutated sodium channel beta-1 subunit polypeptide or fragment and a known ligand.

The invention is particularly useful for screening compounds by using the polypeptides of the invention in transformed cells, transfected or injected oocytes, or animal models bearing mutated sodium channel beta-1 subunits such as transgenic animals or gene targeted (knock-in) animals (see below). Drug candidates can be added to cultured cells that express a mutant SCN1B subunit (a wild-type sodium channel alpha subunit should also be expressed), can be added to oocytes transfected or injected with both a mutant SCN1B subunit and a wild-type sodium channel alpha subunit, or can be administered to an animal model containing a mutant SCN1B subunit. Determining the ability of the test compound to modulate mutant sodium channel activity can be accomplished for example by measuring the effect on the current of the channel (e.g. sodium ion flux) as compared to the current of a cell or animal containing the wild-type sodium channel. Current in cells can be measured using the patch-clamp technique (methods described in Hamill et al, 1981) or using fluorescence based assays as are known in the art (see Gonzalez et al. 1999). Drug candidates that alter the current to a more normal level are useful for treating or preventing epilepsy as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction.

Another technique for drug screening provides high-throughput screening for compounds having suitable binding affinity to the mutant sodium channel beta-1 subunit polypeptides or sodium channels containing these (see PCT published application WO84/03564). In this stated technique, large numbers of small peptide test compounds can be synthesised on a solid substrate (such as a microtitre plate) and can be assayed for mutant SCN1B subunit polypeptide (alone or in complex with a sodium channel alpha subunit) binding. Bound mutant sodium channel or mutant SCN1B subunit polypeptide is then

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 18 -

detected by methods well known in the art. In a variation of this technique, purified polypeptides of the invention can be coated directly onto plates to identify interacting test compounds.

5 The invention also contemplates the use of competition drug screening assays in which neutralizing antibodies capable of specifically binding the mutant sodium channel compete with a test compound for binding thereto. In this manner, the antibodies can be used to
10 detect the presence of any peptide that shares one or more antigenic determinants of the mutant sodium channel.

 The polypeptides of the present invention may also be used for screening compounds developed as a result of combinatorial library technology. This provides a way to
15 test a large number of different substances for their ability to modulate activity of a polypeptide. 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*
20 pharmaceutical applications. In addition, a mimic or mimetic of the substance may be designed for pharmaceutical use. The design of mimetics based on a known pharmaceutically active compound ("lead" compound) is a common approach to the development of novel
25 pharmaceuticals. This is often desirable where the original active compound is difficult or expensive to synthesise or where it provides an unsuitable method of administration. In the design of a mimetic, particular parts of the original active compound that are important
30 in determining the target property are identified. These parts or residues constituting the active region of the compound are known as its pharmacophore. Once found, the pharmacophore structure is modelled according to its physical properties using data from a range of sources
35 including x-ray diffraction data and NMR. A template molecule is then selected onto which chemical groups which mimic the pharmacophore can be added. The selection can be

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 19 -

made such that the mimetic is easy to synthesise, is likely to be pharmacologically acceptable, does not degrade *in vivo* and retains the biological activity of the lead compound. Further optimisation or modification can be carried out to select one or more final mimetics useful for *in vivo* or clinical testing.

It is also possible to isolate a target-specific antibody and then solve its crystal structure. In principle, this approach yields a pharmacophore upon which subsequent drug design can be based as described above. It may be possible to avoid 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 analogue of the original receptor. The anti-id could then be used to isolate peptides from chemically or biologically produced peptide banks.

Compounds identified through screening procedures as described above, and which are based on the use of the mutant nucleic acid and polypeptides of the invention, can also be tested for their effect on correcting the functional deficit imposed by other gene mutations in affected individuals including other sodium channel subunit mutations.

Such compounds form a part of the present invention, as do pharmaceutical compositions containing these and a pharmaceutically acceptable carrier.

30 Pharmaceutical preparations

Compounds identified from screening assays and shown to restore sodium channel wild-type activity can be administered to a patient at a therapeutically effective dose to treat or ameliorate epilepsy as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction. A therapeutically effective dose refers to that amount of the compound sufficient to result in amelioration of

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 20 -

symptoms of epilepsy.

Toxicity and therapeutic efficacy of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals. The data obtained from these studies can then be used in the formulation of a range of dosages for use in humans.

Pharmaceutical compositions for use in accordance with the present invention can be formulated in a conventional manner using one or more physiological acceptable carriers, excipients or stabilisers which are well known. Acceptable carriers, excipients or stabilizers are nontoxic at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; binding agents including hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as Tween, Pluronic or polyethylene glycol (PEG).

The formulation of pharmaceutical compositions for use in accordance with the present invention will be based on the proposed route of administration. Routes of administration may include, but are not limited to, inhalation, insufflation (either through the mouth or nose), oral, buccal, rectal or parental administration.

Diagnostic applications

Polynucleotide sequences of the invention may be used for the diagnosis of epilepsy as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction, and the use of the nucleic acid molecules of the invention in diagnosis

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 21 -

of these disorders, is therefore contemplated.

In another embodiment of the invention, the polynucleotides that may be used for diagnostic purposes include oligonucleotide sequences, genomic DNA and complementary RNA and DNA molecules. The polynucleotides may be used to detect and quantitate gene expression in biological samples. Genomic DNA used for the diagnosis may be obtained from body cells, such as those present in the blood, tissue biopsy, surgical specimen, or autopsy material. The DNA may be isolated and used directly for detection of a specific sequence or may be amplified by the polymerase chain reaction (PCR) prior to analysis. Similarly, RNA or cDNA may also be used, with or without PCR amplification. To detect a specific nucleic acid sequence, hybridisation using specific oligonucleotides, PCR mapping, RNase protection, and various other methods may be employed. For instance direct nucleotide sequencing of amplification products from the sodium channel subunits of patients can be employed. Sequence of the sample amplicon is compared to that of the wild-type amplicon to determine the presence (or absence) of nucleotide differences. In addition, restriction enzyme digest and mapping can be employed for the specific C to T mutation in the SCN1B subunit described in this invention. The C to T transition at amino acid residue 85 of this subunit destroys a *CfoI* restriction site. The DNA from an affected individual as well as a normal control may be amplified using oligonucleotides flanking the C to T nucleotide mutation. The amplification product may then be digested by *CfoI* to provide a fingerprint for comparison to the DNA fingerprint of wild-type SCN1B. The DNA from an individual containing the C to T nucleotide mutation of the present invention will not be able to be digested with this enzyme however the DNA amplified from a normal individual will digest with *CfoI*.

According to a further aspect of the invention there is provided the use of a polypeptide, as described above,

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 22 -

in the diagnosis of epilepsy as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction.

When a diagnostic assay is to be based upon mutant SCN1B proteins constituting a sodium channel, a variety of approaches are possible. For example, diagnosis can be achieved by monitoring differences in the electrophoretic mobility of normal and mutant SCN1B subunit proteins that form part of the sodium channel. Such an approach will be particularly useful in identifying mutants in which charge substitutions are present, or in which insertions, deletions or substitutions have resulted in a significant change in the electrophoretic migration of the resultant protein. Alternatively, diagnosis may be based upon differences in the proteolytic cleavage patterns of normal and mutant proteins, differences in molar ratios of the various amino acid residues, or by functional assays demonstrating altered function of the gene products.

In another aspect, antibodies that specifically bind mutant sodium channels may be used for the diagnosis of a disorder, or in assays to monitor patients being treated with agonists, antagonists or modulators of the mutant sodium channel. Antibodies useful for diagnostic purposes may be prepared in the same manner as described above for therapeutics. Diagnostic assays to detect mutant sodium channels include methods that utilize the antibody and a label to detect a mutant sodium channel in human body fluids or in extracts of cells or tissues. The antibodies may be used with or without modification, and may be labelled by covalent or non-covalent attachment of a reporter molecule.

A variety of protocols for measuring the presence of mutant sodium channels, including ELISAs, RIAs, and FACS, are known in the art and provide a basis for diagnosing epilepsy, in particular generalised epilepsy with febrile seizures plus. The expression of a mutant channel is established by combining body fluids or cell extracts taken from test mammalian subjects, preferably human, with

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 23 -

antibody to the channel under conditions suitable for complex formation. The amount of complex formation may be quantitated by various methods, preferably by photometric means. Antibodies specific for the mutant channel will
5 only bind to individuals expressing the said mutant channel and not to individuals expressing only wild-type channels (ie normal individuals). This establishes the basis for diagnosing the disease.

Once an individual has been diagnosed with the
10 disorder, effective treatments can be initiated. These may include administering a selective modulator of the mutant channel or an antagonist to the mutant channel such as an antibody or mutant complement as described above. Alternative treatments include the administering of a
15 selective agonist or modulator to the mutant channel so as to restore channel function to a normal level.

Microarray

In further embodiments, complete cDNAs,
20 oligonucleotides or longer fragments derived from any of the polynucleotide sequences described herein may be used as probes in a microarray. The microarray can be used to monitor the expression level of large numbers of genes simultaneously and to identify genetic variants,
25 mutations, and polymorphisms. This information may be used to determine gene function, to understand the genetic basis of a disorder, to diagnose a disorder, and to develop and monitor the activities of therapeutic agents. Microarrays may be prepared, used, and analyzed using
30 methods known in the art. (For example, see Schena et al., 1996; Heller et al., 1997).

According to a further aspect of the present invention, neurological material obtained from animal
models generated as a result of the identification of
35 specific sodium channel beta-1 subunit human mutations, particularly those disclosed in the present invention, can be used in microarray experiments. These experiments can

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 24 -

be conducted to identify the level of expression of specific sodium channel beta-1 subunits, or any cDNA clones from whole-brain libraries, in epileptic brain tissue as opposed to normal control brain tissue. Variations in the expression level of genes, including sodium channel beta-1 subunits, between the two tissues indicates their involvement in the epileptic process either as a cause or consequence of the original sodium channel mutation present in the animal model. Microarrays may be prepared, as described above.

Transformed hosts

The present invention also provides for the production of genetically modified (knock-out, knock-in and transgenic), non-human animal models transformed with the nucleic acid molecules of the invention. These animals are useful for the study of the function of a sodium channel, to study the mechanisms of disease as related to a sodium channel, for the screening of candidate pharmaceutical compounds, for the creation of explanted mammalian cell cultures which express a mutant sodium channel and for the evaluation of potential therapeutic interventions.

Animal species which are suitable for use in the animal models of the present invention include, but are not limited to, rats, mice, hamsters, guinea pigs, rabbits, dogs, cats, goats, sheep, pigs, and non-human primates such as monkeys and chimpanzees. For initial studies, genetically modified mice and rats are highly desirable due to the relative ease of generation of knock-in, knock-out and transgenic animals and their ease of maintenance and shorter life spans. For certain studies, transgenic yeast or invertebrates may be suitable and preferred because they allow for rapid screening and provide for much easier handling. For longer term studies, non-human primates may be desired due to their similarity with humans.

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 25 -

To create an animal model for a mutated sodium channel of the invention several methods can be employed. These include but are not limited to generation of a specific mutation in a homologous animal gene, insertion of a wild type human gene and/or a humanized animal gene by homologous recombination, insertion of a mutant (single or multiple) human gene as genomic or minigene cDNA constructs using wild type or mutant or artificial promoter elements or insertion of artificially modified fragments of the endogenous gene by homologous recombination. The modifications include insertion of mutant stop codons, the deletion of DNA sequences, or the inclusion of recombination elements (lox p sites) recognized by enzymes such as Cre recombinase.

To create transgenic or gene targeted (knock-in)mice, which are preferred, a mutant version of a sodium channel beta-1 subunit can be inserted into a mouse germ line using standard techniques of oocyte microinjection. Alternatively, if it is desired to inactivate or replace an endogenous sodium channel beta-1 subunit gene, homologous recombination using embryonic stem cells may be applied.

For oocyte injection, one or more copies of the mutant sodium channel beta-1 subunit gene can be inserted into the pronucleus of a just-fertilized mouse oocyte. This oocyte is then reimplanted into a pseudo-pregnant foster mother. The liveborn mice can then be screened for integrants using analysis of tail DNA or DNA from other tissues for the presence of the particular human subunit gene sequence. The transgene can be either a complete genomic sequence injected as a YAC, BAC, PAC or other chromosome DNA fragment, a complete cDNA with either the natural promoter or a heterologous promoter, or a minigene containing all of the coding region and other elements found to be necessary for optimum expression.

According to still another aspect of the invention there is provided the use of genetically modified non-

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 26 -

human animals as described above for the screening of candidate pharmaceutical compounds (see drug screening above). These animals are also useful for the evaluation (eg therapeutic efficacy, toxicity, metabolism) of candidate pharmaceutical compounds, including those identified from the invention as described above, for the treatment of epilepsy and/or other disorders associated with sodium channel dysfunction.

It will be clearly understood that, although a number of prior art publications are referred to herein, this reference does not constitute an admission that any of these documents forms part of the common general knowledge in the art, in Australia or in any other country.

Throughout this specification and the claims, the words "comprise", "comprises" and "comprising" are used in a non-exclusive sense, except where the context requires otherwise.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows the GEFS+ pedigree for the family containing the R85C mutation. Individuals containing the mutation are indicated. The original proband is marked as P.

Figure 2 shows a sequencing trace of the SCN1B mutation identified in this study. The sequencing trace for the affected individual is represented by the top panel indicating the C→T nucleotide change, while the bottom panel shows the sequencing trace of a normal individual.

Figure 3 shows sodium channel amino acid alignments surrounding the SCN1B mutation. The SCN1B highly conserved arginine amino acid at position 85 is boxed. This amino acid is also highly conserved in members of the immunoglobulin gene superfamily but is not conserved in other SCNB subunits.

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 27 -

Modes for Performing the Invention

Example 1: Clinical diagnosis of affected family members

A group of 4 family members spanning 3 generations was studied because of the occurrence of generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) phenotypes (see Figure 1 for pedigree).

The proband (P) was ascertained through routine clinical practice, and has an affected first degree relative and multiple affected second degree relatives. In the family members so far studied, all affected individuals have had the phenotype of FS+, with infrequent (range 5-10) febrile and afebrile tonic-clonic seizures commencing between the ages of 15 months and 2 years, and in the 2 older affected cases, ceasing by mid-childhood and the early teenage years respectively. All are intellectually normal and otherwise healthy. The extended family is known to have a large number of other individuals (approximately 13) whose phenotypes are consistent with GEFS+. There are no known consanguineous relationships in the family.

Example 2: Mutation analysis of SCN1B

Single stranded conformation polymorphism (SSCP) analysis and sequencing were performed on GEFS+ affected individuals to identify disease causing mutations.

Primers used for SSCP were labelled at their 5' end with HEX. The primers were designed within flanking SCN1B introns to enable amplification of each exon of SCN1B (Table 1 and SEQ ID Numbers:3-12). Typical PCR reactions were performed in a total volume of 10 µl using 30 ng of patient DNA. PCR reactions were performed in 96 well plates or 0.5 ml tubes depending on batch size, and contained 67 mM Tris-HCl (pH 8.8); 16.5 mM (NH₄)₂SO₄; 6.5 µM EDTA; 1.5 mM MgCl₂; 200 µM each dNTP; 10% DMSO; 0.17 mg/ml BSA; 10 mM β-mercaptoethanol; 15 µg/ml each primer and 100 U/ml Taq DNA polymerase. For exons 1, 2, 4 and 5, PCR reactions were performed using 10 cycles of 94°C for 30

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 28 -

seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds followed by 25 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. A final extension reaction for 10 minutes at 72°C followed. For exon 3, PCR reactions were performed using 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 62°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds with a final extension reaction for 10 minutes at 72°C. Twenty µl of loading dye comprising 50% (v/v) formamide, 12.5 mM EDTA and 0.02% (w/v) bromophenol blue were added to completed reactions which were subsequently run on non-denaturing 4% polyacrylamide gels with a cross-linking ratio of 35:1 (acrylamide:bis-acrylamide) and containing 2% glycerol. Gel thickness was 100µm, width 168mm and length 160mm. Gels were run at 1200 volts and approximately 20mA, at ambient temperature using the GelScan 2000 system (Corbett Research, Australia) according to manufacturers specifications. Results were subsequently analysed using the ONE-Dscan gel analysis software package (Scanalytics Inc.).

PCR products showing a conformational change were subsequently sequenced. This first involved re-amplification of the relevant amplicon using primers without the 5' HEX addition followed by purification of the PCR amplified templates for sequencing using QiaQuick PCR preps (Qiagen) based on manufacturers procedures. The primers used to sequence the purified SCN1B amplicons were identical to those used for the initial amplification step. For each sequencing reaction, 25 ng of primer and 100 ng of purified PCR template were used. The BigDye sequencing kit (ABI) was used for all sequencing reactions according to the manufacturers specifications. The products were run on an ABI 377 Sequencer and analysed using the EditView program.

A total of 53 unrelated GEFS+ patients were screened by fluorescent-SSCP analysis and sequencing. No mutations were found in 17 sporadic cases of GEFS+ tested. Of the 36 families tested, 3 were found to have point mutations in

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 29 -

SCN1A (Wallace et al. 2001), two were found to contain the C121W mutation in SCN1B (Wallace et al. 1998) and a single family (Figure 1) identified a novel SCN1B mutation in exon 3 due to a C to T nucleotide mutation at position 253 as represented by SEQ ID NO:1. The nucleotide change results in the replacement of an arginine amino acid residue for a cysteine residue at position 85 of the encoded protein, as represented by SEQ ID NO:2. Each of these changes were not present in the control population.

TABLE 1

Primers Used for SSCP Analysis of SCN1B			
Exon	Forward	Reverse	Size (bp)
1	CGCCTCTCGCCCCGCTATTA	CTCCCGCCGCCCCGCCGTG	169
2	CCTGACCTGAGCCTGCTGTC	TGCCCTCCCATGCCGTTAA	228
3	CCTTCCCCTCCCTGGCTAC	GGCAGGCAGCACCCGACTCA	285
4	CAGCCTGGGCTACCCCTTA	CCCTGGGTGCCCTCCACCT	220
5	CGGTCTGATGATGGGGTCAC	TTACGGCTGGCTCTTCCTTG	243

Example 3: Characteristics of the novel SCN1B mutation

The C to T nucleotide change of the present invention results in the destruction of the *Cfo*I restriction enzyme site. This provides a means for diagnosing epilepsy in individuals containing this mutation. For example DNA obtained from the individual to be tested can be amplified with primers as used in the SSCP analysis of exon 3 (SEQ ID Numbers: 7 and 8). The resultant amplified DNA can subsequently be purified and digested with the restriction enzyme *Cfo*I. Amplimers that contain the C to T nucleotide change will not be digested by this enzyme whereas the amplimer generated from wild-type individuals will be

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 30 -

reduced in size compared to that of an affected individual due to digestion of the amplicon.

In both the C121W and R85C SCN1B mutations, the amino acid substitution occurs in the extracellular amino-terminal domain of the protein. Voltage-gated sodium channel beta subunits (beta-1, beta-2) are integral membrane proteins having a single transmembrane region and a prominent extracellular amino-terminal domain. Recombinant sodium channel beta-1 subunits have been demonstrated to exert significant modulatory effects on the gating behaviour and expression levels of various alpha subunits, including brain isoforms (Isom et al. 1992; Makita et al. 1994). The functional effects of the beta-1 subunit on gating modulation are dependant on structures located primarily in the extracellular domain (McCormick et al. 1998; Makita et al. 1996). The extracellular domain contains a single immuno-globulin like fold motif bearing a high degree of amino-acid similarity to corresponding regions of a neural cell adhesion molecule (contactin) and other members of the immunoglobulin gene superfamily (Isom et al. 1995; McCormick et al. 1998). This motif is structurally maintained by a single putative disulfide bridge between two highly conserved cysteine residues, including Cys121 in SCN1B. Therefore the C121W mutation is likely to disrupt the disulfide bridge which may alter the secondary structure of the extracellular domain. Interestingly, the novel SCN1B mutation which constitutes a preferred embodiment of the present invention (R85C) replaces an arginine residue with a cysteine residue. The presence of this cysteine residue may affect the functioning of the ion-channel through interference with normal disulfide bridge formation or other, as yet undetermined, mechanisms.

The genetic heterogeneity of GEFS+ is now well established. Screening of SCN1B and SCN1A in a panel of 53 patients indicates that no mutations were found in the 17

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 31 -

isolated cases of GEFS+. However, the frequency of GEFS+ causing mutations in each of these genes in the remaining 36 familial cases was ~17% (6/36). The low proportion of GEFS+ cases caused by these two sodium channel genes indicates that other genes are involved. Obvious candidates include other neuronal sodium channels and proteins that interact with sodium channels. The confirmation that SCN1B is one of the many genes likely to be responsible for febrile seizures raises the possibility of greater diagnostic accuracy, more precise genetic counselling and a more rational basis for treatment for febrile seizures and generalised epilepsy.

Example 4: Analysis of mutant SCN1B subunits and sodium channels incorporating these

The following methods are used to determine the structure and function of mutant SCN1B subunits and sodium channels incorporating these.

Molecular biological studies

The ability of a mutant sodium channel of the invention as a whole or through individual mutant beta-1 subunits to bind known and unknown proteins can be examined. Procedures such as the yeast two-hybrid system are used to discover and identify any functional partners. The principle behind the yeast two-hybrid procedure is that many eukaryotic transcriptional activators, including those in yeast, consist of two discrete modular domains. The first is a DNA-binding domain that binds to a specific promoter sequence and the second is an activation domain that directs the RNA polymerase II complex to transcribe the gene downstream of the DNA binding site. Both domains are required for transcriptional activation as neither domain can activate transcription on its own. In the yeast two-hybrid procedure, the gene of interest or parts thereof (BAIT), is cloned in such a way that it is expressed as a fusion to a peptide that has a DNA binding

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 32 -

domain. A second gene, or number of genes, such as those from a cDNA library (TARGET), is cloned so that it is expressed as a fusion to an activation domain. Interaction of the protein of interest with its binding partner brings the DNA-binding peptide together with the activation domain and initiates transcription of the reporter genes. The first reporter gene will select for yeast cells that contain interacting proteins (this reporter is usually a nutritional gene required for growth on selective media). The second reporter is used for confirmation and while being expressed in response to interacting proteins it is usually not required for growth.

The nature of the sodium channel interacting genes and proteins can also be studied such that these partners can also be targets for drug discovery.

Structural studies

SCN1B recombinant proteins of the invention can be produced in bacterial, yeast, insect and/or mammalian cells and used in crystallographical and NMR studies. Together with molecular modeling of the proteins as well as modeling of sodium channels incorporating these, structure-driven drug design can be facilitated.

Example 5: Generation of polyclonal antibodies

Antibodies can be made to selectively bind and distinguish mutant SCN1B protein from wild-type protein. Antibodies specific for mutagenised epitopes are especially useful in cell culture assays to screen for cells which have been treated with pharmaceutical agents to evaluate the therapeutic potential of the agent.

To prepare polyclonal antibodies, short peptides can be designed homologous to the SCN1B amino acid sequence. Such peptides are typically 10 to 15 amino acids in length. These peptides should be designed in regions of least homology to other receptor subunits and should also have poor homology to the mouse orthologue to avoid cross species interactions in further down-stream experiments

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 33 -

such as monoclonal antibody production. Synthetic peptides can then be conjugated to biotin (Sulfo-NHS-LC Biotin) using standard protocols supplied with commercially available kits such as the PIERCE™ kit (PIERCE).
5 Biotinylated peptides are subsequently complexed with avidin in solution and for each peptide complex, 2 rabbits are immunized with 4 doses of antigen (200 µg per dose) in intervals of three weeks between doses. The initial dose is mixed with Freund's Complete adjuvant while subsequent
10 doses are combined with Freund's Immuno-adjuvant. After completion of the immunization, rabbits are test bled and reactivity of sera is assayed by dot blot with serial dilutions of the original peptides. If rabbits show significant reactivity compared with pre-immune sera, they
15 are then sacrificed and the blood collected such that immune sera can be separated for further experiments.

Antibodies to mutant beta-1 subunits can be used to detect the presence and the relative level of the mutant forms in various tissues.

20
Example 6: Generation of monoclonal antibodies

Monoclonal antibodies can be prepared in the following manner. Immunogen comprising an intact mutant SCN1B subunit protein or mutant SCN1B subunit peptide is
25 injected in Freund's adjuvant into mice with each mouse receiving four injections of 10 to 100 µg of immunogen. After the fourth injection blood samples taken from the mice are examined for the presence of antibody to the immunogen. Immune mice are sacrificed, their spleens
30 removed and single cell suspensions are prepared (Harlow and Lane, 1988). The spleen cells serve as a source of lymphocytes, which are then fused with a permanently growing myeloma partner cell (Kohler and Milstein, 1975). Cells are plated at a density of 2×10^5 cells/well in 96
35 well plates and individual wells are examined for growth. These wells are then tested for the presence of GABA receptor subunit specific antibodies by ELISA or RIA using

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 34 -

wild type or mutant subunit target protein. Cells in positive wells are expanded and subcloned to establish and confirm monoclonality. Clones with the desired specificity are expanded and grown as ascites in mice followed by
5 purification using affinity chromatography using Protein A Sepharose, ion-exchange chromatography or variations and combinations of these techniques.

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 35 -

References:

References cited herein are listed on the following pages, and are incorporated herein by this reference.

- 5 Alekov, AK. et al. (2000). *J Physiol.* 529: 533-539.
- Annegers, JF. (1996). *The treatment of epilepsy: Principles and practice.* Second Edition. (Wyllie E (Ed) Williams and Wilkins).
- 10 Baulac, S. et al. (1999). *Am. J. Hum. Genet.* 65: 1078-1085.
- Berkovic, SF. et al. (1987). *Neurology* 37: 993-1000.
- Berkovic, SF. Et al. (1994). *The epilepsies: specific syndromes or a neurobiological continuum?* In: *Epileptic seizures and syndromes* (Wolf (Ed) London: John Lidey). 25-37.
- 15 Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. (1989). *Epilepsia.* 30: 389-399.
- Escayg, A. et al. (2000). *Nature Genet.* 24: 343-345.
- 20 Gardiner, M. (2000). *J Neurol.* 247: 327-334.
- Gonzalez, JE. et al. (1999). *Drug Discov. Today* 4: 431-439.
- Hamill, OP. et al. (1981). *Pflugers Arch.* 391: 85-100.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- 25 Huse, WD. et al. (1989). *Science* 246: 1275-1281.
- Isom, LL. et al. (1992). *Science* 256: 839-842.
- Isom, LL. et al. (1995). *Cell* 83: 433-442.
- 30 Kohler, G. and Milstein, C. (1975). *Nature* 256: 495-497.
- Lopes-Cendes, I. et al. (2000). *Am. J. Hum. Genet.* 66: 698-701.
- Makita, N. et al. (1994). *J. Biol. Chem.* 269: 7571-7578.
- Makita N. et al. (1996). *J. Neurosci.* 16: 7117-7127.
- 35 McCormick, KA. et al. (1998). *J. Biol. Chem.* 273: 3954-3962.
- Moulard, B. et al. (1999). *Am. J. Hum. Genet.* 65: 1396-

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 36 -

1400.
Peiffer, A. et al. (1999). *Ann. Neurol.* 46: 671-678.
Reutens, DC. and Berkovic, SF. (1995). *Neurology* 45: 1469-1476.
- 5 Roger, J. et al. (1992). *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*. Second Edition. (John Libbey, London).
- Scheffer, IE. et al. (2000). *Ann. Neurol.* 47: 840-841.
Scheffer, IE. and Berkovic, SF. (1997). *Brain* 120 : 479-10 490.
- Singh, R. et al. (1999). *Ann Neurol.* 45: 75-81.
Sutton, GC. (1990). *The principles and practice of medical genetics*. Second Edition. (Churchill Livingstone, NY).
- Wallace, RH. et al. (2001). *Am. J. Hum. Genet.* 68: 859-15 865.
- Wallace, RH. et al. (1998). *Nature Genet.* 19: 366-370.

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 37 -

Claims:

1. An isolated nucleic acid molecule encoding a mutant mammalian beta-1 subunit of a voltage-gated sodium channel wherein a mutation event has occurred and said mutation event disrupts the functioning of an assembled sodium channel so as to produce an epilepsy phenotype, with the proviso that said mutation event is not one which results in a C121W substitution in the encoded polypeptide.
2. An isolated nucleic acid molecule as claimed in claim 1 wherein said mutation event results in the introduction of a cysteine residue in the extracellular loop of the amino terminal domain of the encoded polypeptide.
3. An isolated nucleic acid molecule as claimed in claim 2 wherein said mutation event takes place in exon 3.
4. An isolated nucleic acid molecule as claimed in claim 3 wherein said mutation event occurs at position 253 of the coding sequence.
5. An isolated nucleic acid molecule as claimed in claim 4 wherein said mutation event is a C to T nucleotide substitution.
6. An isolated nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1.
7. An isolated nucleic acid molecule consisting of the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1.
8. An isolated mammalian polypeptide, said polypeptide being a mutant mammalian beta-1 subunit of a voltage-gated sodium channel wherein a mutation event has occurred and said mutation event disrupts the functioning of an assembled sodium channel so as to produce an epilepsy

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 38 -

phenotype, with the proviso that said mutation event is not a C121W substitution.

9. An isolated polypeptide as claimed in claim 8 wherein said mutation event introduces a cysteine residue to the extracellular loop of the amino terminal domain of the polypeptide.

10. An isolated polypeptide as claimed in claim 8 wherein said mutation event occurs at position 85.

11. An isolated polypeptide as claimed in claim 10 wherein said mutation event is an R85C substitution.

12. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2.

13. An isolated polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2.

14. An isolated polypeptide complex, said polypeptide complex being an assembled mammalian voltage-gated sodium channel in which a mutation event has occurred in the beta-1 subunit and said mutation event disrupts the functioning of the assembled sodium channel so as to produce an epilepsy phenotype, with the proviso that said mutation event is not a C121W substitution.

15. An isolated polypeptide complex, as claimed in claim 14 wherein said mutation event introduces a cysteine residue to the extracellular loop of the amino terminal domain of the beta-1 subunit.

16. An isolated polypeptide complex as claimed in claim 15 wherein said mutation event occurs at position 85 in the beta-1 subunit.

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 39 -

17. An isolated polypeptide complex as claimed in claim 16 wherein said mutation event is an R85C substitution.

5 18. A cell transformed with an isolated nucleic acid molecule as claimed in any one of claims 1 to 7.

19. A cell comprising mammalian sodium channels incorporating a mutant beta-1 subunit as defined in any
10 one of claims 8 to 11.

20. A method of preparing a polypeptide, comprising the steps of:

(1) culturing cells as claimed in claim 18 or 19
15 under conditions effective for polypeptide production; and
(2) harvesting the polypeptide.

21. A polypeptide prepared by the method of claim 20.

20 22. An antibody which is immunologically reactive with an isolated polypeptide as claimed in any one of claims 8 to 13, a polypeptide as claimed in claim 21, or an isolated polypeptide complex as claimed in any one of claims 14-17.

25 23. An antibody as claimed in claim 22 which is selected from the group consisting of a monoclonal antibody, a humanised antibody, a chimaeric antibody or an antibody fragment including a Fab fragment, (Fab')₂ fragment, Fv fragment, single chain antibodies and single domain
30 antibodies.

24. A method of treating epilepsy as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction, comprising administering a selective agonist, antagonist
35 or modulator of the sodium channel when it has undergone a mutation event as defined in any one of claims 8 to 11 or 14 to 17 to a subject in need of such treatment.

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 40 -

25. The use of a selective agonist, antagonist or modulator of the sodium channel when it has undergone a mutation event as defined in any one of claims 8 to 11 or
5 14 to 17 in the manufacture of a medicament for the treatment of epilepsy as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction.

26. A method of treating epilepsy as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction comprising administering an antibody as claimed in either
10 one of claims 22 or 23 to a subject in need of such treatment.

27. A method of treating epilepsy as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction, comprising administering an isolated DNA molecule which is the complement (antisense) of a nucleic acid molecule as defined in any one of claims 1 to 7 and which encodes an
20 RNA molecule that hybridizes with the mRNA encoding a mutant sodium channel beta-1 subunit, to a subject in need of such treatment.

28. The use of a DNA molecule which is the complement of a nucleic acid molecule as defined in any one of claims 1 to 7 and which encodes an RNA molecule that hybridizes with the mRNA encoding a mutant sodium channel beta-1 subunit, in the manufacture of a medicament for the treatment of epilepsy as well as other disorders
30 associated with sodium channel dysfunction.

29. A method of treating epilepsy as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction, comprising administering an antibody, as claimed in either
35 one of claims 22 or 23 or a DNA molecule which is the complement of a nucleic acid molecule as defined in any one of claims 1 to 7 and which encodes an RNA molecule

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 41 -

that hybridizes with the mRNA encoding a mutant sodium channel beta-1 subunit, in combination with administration of wild-type SCN1B, to a subject in need of such treatment.

5

30. The use of an antibody, as claimed in claims 22 or 23 or a DNA molecule which is the complement of a nucleic acid molecule as defined in any one of claims 1 to 7 and which encodes an RNA molecule that hybridizes with the mRNA encoding a mutant sodium channel beta-1 subunit, in combination with the use of wild-type SCN1B, in the manufacture of a medicament for the treatment of epilepsy as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction.

10

31. Use of a polypeptide as claimed in any one of claims 8 to 13 or a polypeptide complex as claimed in any one of claims 14 to 17 for the screening of candidate pharmaceutical agents.

15

32. Use as claimed in claim 31 wherein high throughput screening techniques are employed.

20

33. A method of screening for a modulator of sodium channel activity useful in the treatment of epilepsy as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction comprising the steps of:

- a) providing a cell as claimed in claim 18 or 19;
- b) contacting said cell with a test compound; and
- 30 c) detecting if said test compound binds the encoded protein or modulates the biological activity of a sodium channel incorporating the encoded protein;

wherein a test compound that binds the protein or modulates biological activity of a sodium channel incorporating the encoded protein is a compound useful for the treatment of the disorder.

25

35

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 42 -

34. A method of screening for a modulator of sodium channel activity useful in the treatment of epilepsy as well as other disorders associated with sodium channel dysfunction comprising the steps of:

- 5 a) providing a polypeptide as claimed in any one of claims 8 to 13 or a polypeptide complex as claimed in any one of claims 14-17;
- b) contacting said polypeptide or polypeptide complex with a test compound; and
- 10 c) detecting if said test compound binds the polypeptide or polypeptide complex;

wherein a test compound that binds the polypeptide or polypeptide complex is a compound useful for the treatment of the disorder.

- 15 35. A compound when identified by a method as claimed in either one of claims 33 or 34.

36. A pharmaceutical composition comprising a compound as claimed in claim 35 and a pharmaceutically acceptable
- 20 carrier.

37. A genetically modified non-human animal transformed with an isolated nucleic acid molecule as defined in any one of claims 1 to 7.
- 25

38. A genetically modified non-human animal as claimed in claim 37 in which the animal is selected from the group consisting of rats, mice, hamsters, guinea pigs, rabbits, dogs, cats, goats, sheep, pigs and non-human primates such as monkeys and chimpanzees.
- 30

39. The use of a genetically modified non-human animal as claimed in claim 37 or 38 in the screening of candidate pharmaceutical compounds.
- 35

40. An expression vector comprising a DNA molecule as claimed in any one of claims 1 to 7.

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

- 43 -

41. The use of a DNA molecule as claimed in any one of
claims 1 to 7 in the diagnosis of epilepsy, in particular
generalised epilepsy with febrile seizures plus, and other
5 disorders associated with sodium channel dysfunction.

42. The use of a polypeptide as defined in any one of
claims 8 to 17 in the diagnosis of epilepsy, in particular
generalised epilepsy with febrile seizures plus, as well
10 as other disorders associated with sodium channel
dysfunction.

43. The use of an antibody as defined in claim 22 or 23
in the diagnosis of epilepsy, in particular generalised
15 epilepsy with febrile seizures plus, as well as other
disorders associated with sodium channel dysfunction.

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

SCN1BR85CPCTappn.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Bionomics Limited
<120> P12
<130> SCN1B (R85C)
<160> 12
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 1414
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 1
gtctccgggg acattctaac cgcgcgcagg tccgcgcgc tctcgcccg ctattaatac
60
cggcggcccg ggaggggggc gcagcacgcg ccgcgcagcc atggggaggc tgctggcctt
120
agtggtcggc gcggcactgg tgtcctcagc ctgcgggggc tgcgtggagg tggactcgga
180
gaccgaggcc gtgtatggga tgaccttcaa aattctttgc atctcctgca agcgcgcgag
240
cgagaccaac gctgagacct tcaccgagtg gaccttcgc cagaagggca ctgaggagtt
300
tgtcaagatc ctgcgctatg agaatgaggt gttgcagctg gaggaggatg agtgcttcga
360
gggcccgcgtg gtgtggaatg gcagccgggg caccaaagac ctgcaggatc tgtctatctt
420
catcaccaat gtcacctaca accactcggg cgactacgag tgccacgtct accgectgct
480
cttcttcgaa aactacgagc acaacaccag cgtcgtcaag aagatccaca ttgaggtagt
540
ggacaaaagc aacagagaca tggcatccat cgtgtctgag atcatgatgt atgtgtcat

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

SCN1BR85CPCTapppn.ST25.txt

600
tgtggtgttg accatattggc tcgtggcaga gatgatttac tgctacaaga agatcgctgc
660
cgccacggag actgctgcac aggagaatgc ctgggaatac ctggccatca cctctgaaag
720
caaagagaac tgcacggggcg tccagggtggc cgaatagccc tggccctggg ccccgctca
780
agggaagagc agccgtaatg gggactctcc aggcaccgcc tgccccagc gtgggggtgg
840
ccactcctgg gcccagaaa gcctcagagt cctgccgacg gagccactgg ggtggggagg
900
ggcagggggc ttggctcgca ccccacttt cgcctctcc agctcctgcc ccgcccgcg
960
cgcaccgcca tgcatgatgg gtaaagcaat actgccgctg cccccacct gcttctgctg
1020
cctgtttggg gagggggggc gtgaggtggg ggcagcgcc ccgcaacct cctccttgc
1080
gatttgaca catlggccgc ttcagacacg cacttctggg gccagccct ccccgctcc
1140
tccctgcctg gcggcagggg tcgcgatgat gggctggagc agtttggggc agggggttct
1200
gggacccact ccgactcccc ctccccgga tcatttcccc tcccgttcc tccggtgga
1260
cctggggctc cccctccctg taatgcactc ctgccccgc ccaacctgc cctctctac
1320
cagccttga cgtgggccac ctagaaggg gccattcag cctcgtctct ttacagaagt
1380

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

SCN1BR85CPCTappn.ST25.txt
agttttgttc atgaaataaa gactcttgga cttg

1414

<210> 2
<211> 218
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

SCN1BR85CPCTappn.ST25.txt

Glu Met Ile Tyr Cys Tyr Lys Lys Ile Ala Ala Ala Thr Glu Thr Ala
180 185 190

Ala Gln Glu Asn Ala Ser Glu Tyr Leu Ala Ile Thr Ser Glu Ser Lys
195 200 205

Glu Asn Cys Thr Gly Val Gln Val Ala Glu
210 215

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
cgccctctcgc cccgctatta
20

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
ctccccgccgc cccgccgtg
19

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
cctgacctga gcctgctgtc
20

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
tgccctccca tgccgttaa
19

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

SCN1BR85CPCTappn.ST25.txt

<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
ccttccctc cctggtac

19

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
ggcaggcagc acccgactca

20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
cagcctgggc taccacctta

20

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

<400> 10
ccctgggtgc cctccacct

20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
cggtctgatg atggggcac

20

WO 02/090532

PCT/AU02/00581

SCN1BR85CPCTappr.ST25.txt

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
ttaaagggtgg ctcttccttg

20

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/00581
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ : C12N 15/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
SEE BELOW		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SEE BELOW		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
STN (WPIDS;Medline): epilepsy and SCN1B		
GenBank; Swiss-Prot: SEQ ID Nos 1 and 2		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	Nature Genetics 19, pp 366-370 (1998) Wallace et al "Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na ⁺ -channel β 1 subunit gene SCN1B". See whole document	1-36;
X, Y	Am J Hum Genet 68, pp 859-865 (Mar 13, 2001) Wallace et al "Neuronal sodium channel α 1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus". See whole document.	1-21 and 24-36
X, Y	Neurol 247, pp 327-334 (2000) Gardiner "Impact of our understanding of the genetic aetiology of epilepsy". See whole document.	1-21 and 24-36
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☐ See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 June 2002		Date of mailing of the international search report 04 JUL 2002
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6283 3929		Authorized officer  MADHU K. JOGIA Telephone No : (02) 6283 2512

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/00581
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Molecular Brain Research 42, pp 222-226 (1996) Grosson et al "Sequence of the voltage-gated sodium channel β -subunit in wild-type and in quivering mice".	1-21 and 24-36
X	Human Mutation 16, pp 139-142 (2000) Moulard et al "Study of the voltage-gated sodium channel subunit gene (SCN1B) in the benign familial infantile convulsions syndrome (BFIC)".	1-21 and 24-36
X	Biochemical and Biophysical Research Communications 195, pp 679-685 (1993) Tong et al "A single β 1 subunit mapped to mouse chromosome 7 may be a common component of Na channel isoforms from brain, skeletal muscle and heart"	1-21 and 24-36
P, X	European Journal of Pain 6 (Suppl.A), pp 27-34 (2002) Steinlein "Channelopathies can cause epilepsy in man"	1-21 and 24-36
X	J Biol Chem 269, pp 7571-7578 (1994) Makia et al "Voltage-gated Na^+ channel beta 1 subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart, and brain is encoded by a single gene". Relevant to SEQ ID No 1	1-21 and 24-36
X	Gene 170 pp 285-286 (1996) Belcher et al "Cloning of the cDNA encoding the sodium channel beta 1 subunit from rabbit". Relevant to SEQ ID No 1	1-21 and 24-36
P, X	Neurology 58, pp 1426-1429 (2002) Wallace et al "Generalized epilepsy with febrile seizures plus: mutation of the sodium channel subunit SCN1B"	1-21 and 24-36

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/08	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 6
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00	A
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,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,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ワレス, ロビン, ヘザー
アメリカ合衆国, テネシー 3 8 1 0 3, メンフィス, アパートメント 4 2 5, サウス
フォース ストリート 7 0

(72)発明者 イングリッド, アイリーン, シェッフアー
オーストラリア, ヴィクトリア 3 1 4 5, マルヴェーン イースト, セントラル パーク
ロード 2 0

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 DA12 DA13 DA14 DA36
DA37 DA77 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 CA09 DA02 EA02 EA06 FA02 GA30
HA12 HA14 HA15 HA17
4B063 QA17 QA19 QQ43 QQ58 QQ79 QR32 QR62 QR72 QS25 QS33
QS34
4B064 AG01 AG26 AG27 CA19 CA20 CC24 DA03 DA13
4B065 AA90X AA93Y AB01 AC20 BA01 CA44 CA46
4C084 AA13 AA16 BA44 NA14 ZA061
4C086 AA01 AA02 EA16 NA14 ZA06
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA45 EA21 EA50 FA74