(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-504054
(P2004-504054A)
(43)公表日　平成16年2月12日(2004.2.12)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	2G045
A01K 67/027	A01K 67/027		2G060
C07K 14/47	C07K 14/47		4B024
C07K 16/18	C07K 16/18		4B063
C12N 1/15	C12N 1/15		4B064

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 169 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-513866(P2002-513866)
(86)(22)出願日　平成13年7月19日(2001.7.19)
(85)翻訳文提出日　平成15年1月20日(2003.1.20)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/022639
(87)国際公開番号　WO2002/008381
(87)国際公開日　平成14年1月31日(2002.1.31)
(31)優先権主張番号　60/219,738
(32)優先日　平成12年7月20日(2000.7.20)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　500189230
ユニバーシティ・オブ・ユタ・リサーチ・ファウンデーション
アメリカ合衆国８４１０８ユタ州ソルト・レイク・シティ、アラピーン・ドライブ６１５番、スウィート１１０
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆
(74)代理人　100086405
弁理士　河宮　治
(74)代理人　100106231
弁理士　矢野　正樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】薬物誘導型心臓不整脈に関係するＳＣＮ５Ａ中の一般的多型

(57)【要約】
本発明は、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を引起こすＳＣＮ５Ａ中の特定の突然変異に指向される。該突然変異を有する個人は、ある種の薬剤を投与した場合に、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を発病し易い。この素因は、個人のＳＣＮ５ＡのＤＮＡ配列を分析することによって本発明により診断し得る。該突然変異について個人をスクリーニングすることによって、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を回避し得る。さらに、薬物を試験して、それがトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を引起こすかを判定し得る。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号：４で示されるポリペプチドをコードする核酸を含む単離されたＤＮＡ。
【請求項２】
配列番号：１で示されるＤＮＡに核酸プローブがハイブリダイズするのを妨害するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で請求項１記載のＤＮＡに特異的にハイブリダイズする核酸プローブ。
【請求項３】
請求項２記載のプローブの薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動に対する素因を引起こす多型を含む核酸に対するハイブリダイゼーションは許容するが該プローブの配列番号：１で示される核酸に対するハイブリダイゼーションは妨害するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、ＤＮＡまたはＲＮＡの患者の試料に該プローブをハイブリダイズさせることを含み、ここにハイブリダイゼーションシグナルの存在が該多型の存在を示すことを特徴とする該多型を診断する方法。
【請求項４】
患者のＤＮＡまたはＲＮＡを増幅させておき、該増幅ＤＮＡまたはＲＮＡをハイブリダイズさせる請求項３記載の方法。
【請求項５】
ハイブリダイゼーションをイン・サイチュ（ｉｎ　ｓｉｔｕ）で行う請求項３記載の方法。
【請求項６】
配列番号：４で示されるポリペプチドをコードするＳＣＮ５Ａを生じる多型の存在を同定する手段によって行う、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動に対する素因を引起こすヒトＳＣＮ５Ａ中の多型の存在を診断する方法。
【請求項７】
該手段が、
ａ）一本鎖立体構造多型技術を用いて該多型についてアッセイし；
ｂ）ヒトＳＣＮ５Ａを配列決定し；
ｃ）ＲＮアーゼアッセイを行い；
ｄ）対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションを行い；
ｅ）単一塩基伸長アッセイを行い；
ｆ）対立遺伝子特異的ポリメラーゼ連鎖反応を行い；
ｇ）患者の試料からのＳＣＮ５Ａ遺伝子の全体または一部分を増幅させて増幅配列を作成し、その増幅配列を配列決定し；
ｈ）患者の試料からのＳＣＮ５Ａ遺伝子の全体または一部分を分子クローン化してクローン化配列を作成し、そのクローン化配列を配列決定し；
ｉ）患者の試料中のＳＣＮ５Ａ遺伝子配列を増幅させ、その増幅配列を野生型ＳＣＮ５Ａ遺伝子配列を含む核酸プローブにハイブリダイズさせ；
ｊ）該組織中のＳＣＮ５Ａ遺伝子配列を増幅させ、その増幅配列を突然変異ＳＣＮ５Ａ遺伝子配列を含む核酸プローブにハイブリダイズさせ；
ｋ）ＳＣＮ５Ａ遺伝子配列または突然変異ＳＣＮ５Ａ遺伝子配列を含む１またはそれを超える核酸プローブを用いて患者の試料からのＳＣＮ５Ａ遺伝子のイン・サイチュ・ハイブリダイゼーションを測定し；
ｌ）イムノブロッティングを行い；ついで
ｍ）免疫組織化学を行う
ことを含む請求項６記載の方法。
【請求項８】
配列番号：４で示される単離されたポリペプチド。
【請求項９】
請求項８記載のポリペプチドに結合するが、野生型ＳＣＮ５Ａポリペプチドには結合しな

い抗体。
【請求項１０】
患者の試料と請求項９記載の抗体とを反応させることによって患者における突然変異ＳＣＮ５Ａポリペプチドの存在についてアッセイすることからなり、ここに陽性の反応が薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動に対する素因を示すことを特徴とする薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動に対する素因を診断する方法。
【請求項１１】
該抗体がモノクローナル抗体である請求項１０記載の方法。
【請求項１２】
該アッセイがイムノブロッティングを含む請求項１０記載の方法。
【請求項１３】
該アッセイが免疫組織化学技術を含む請求項１０記載の方法。
【請求項１４】
個人からのＳＣＮ５Ａポリペプチドを配列決定するかまたは該個人由来の核酸から合成したＳＣＮ５Ａポリペプチドを配列決定することを含み、ここにアミノ酸残基１１０３にチロシンが存在することが薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動に対する素因を示すことを特徴とする該個人における薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動に対する素因を診断する方法。
【請求項１５】
請求項１記載のＤＮＡでトランスフェクトした細胞。
【請求項１６】
請求項１記載の単離されたＤＮＡを含むベクター。
【請求項１７】
請求項１６記載のベクターでトランスフェクトした細胞。
【請求項１８】
請求項１記載のＤＮＡを含む非ヒトートランスジェニック動物。
【請求項１９】
（ａ）突然変異を有するＳＣＮ５Ａを発現する第１のセットの細胞を浴用溶液に入れ；
（ｂ）工程（ａ）の細胞において第１の誘導Na^+電流を誘導し；
（ｃ）該第１の誘導Na^+電流を測定し；
（ｄ）野生型ＳＣＮ５Ａを発現する第２のセットの細胞を浴用溶液に入れ；
（ｅ）工程（ｄ）の細胞において第２の誘導Na^+電流を誘導し；
（ｆ）該第２の誘導Na^+電流を測定し；
（ｇ）薬剤を工程（ａ）の浴用溶液に添加し；
（ｈ）工程（ｇ）の細胞において第３の誘導Na^+電流を誘導し；
（ｉ）該第３の誘導Na^+電流を測定し；ついで
（ｊ）該第３の誘導Na^+電流が第１の誘導Na^+電流よりも第２の誘導Na^+電流により類似しているかを判定し、ここに第１の誘導Na^+電流よりも第２の誘導Na^+電流に近接する第３の誘導Na^+電流を生じる薬剤が該個人を治療するのに有用であることを含み、該突然変異が配列番号：４で示されるポリペプチドをコードするＳＣＮ５Ａを生じることを特徴とする、ＳＣＮ５Ａ中に突然変異を有する個人を治療するのに有用である薬剤をスクリーニングする方法。
【請求項２０】
該第１のセットの細胞、該第２のセットの細胞または両セットの細胞をトランスジェニック動物から得る請求項１９記載の方法。
【請求項２１】
該第１のセットの細胞、該第２のセットの細胞または両セットの細胞をヒトＳＣＮ５ＡのＲＮＡでトランスフェクトする請求項１９記載の方法。
【請求項２２】
（ａ）野生型ＳＣＮ５Ａを発現する細胞を浴用溶液に入れて電流を測定し；

（ｂ）工程（ａ）の細胞において第１の誘導Ｎａ$^+$電流を誘導し；
（ｃ）該第１の誘導Ｎａ$^+$電流を測定し；
（ｄ）突然変異ＳＣＮ５Ａ（ここに該突然変異ＳＣＮ５Ａは配列番号：４で示されるポリペプチドをコードする）を発現する細胞を浴用溶液に入れて電流を測定し；
（ｅ）工程（ｄ）の細胞において第２の誘導Ｎａ$^+$電流を誘導し；
（ｆ）該第２の誘導Ｎａ$^+$電流を測定し；
（ｇ）薬剤を工程（ｄ）の浴用溶液に入れ；
（ｈ）工程（ｇ）の細胞において第３の誘導Ｎａ$^+$電流を誘導し；
（ｉ）該第３の誘導Ｎａ$^+$電流を測定し；ついで
（ｊ）該薬剤が、該第２の誘導Ｎａ$^+$電流と比較して該第１の誘導Ｎａ$^+$電流により類似するかまたはあまり類似しない該第３の誘導Ｎａ$^+$電流を生じるかを判定することを含み、
ここに該第２の誘導Ｎａ＋電流よりも該第１の誘導Ｎａ＋電流により類似する該第３の誘導Ｎａ＋電流を生じる薬剤が薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を治療または予防するのに有用であることを特徴とする、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を治療または予防するのに有用である薬剤をスクリーニングする方法。
【請求項２３】
ｉ）工程（ａ）の該細胞、ｉｉ）工程（ｄ）の該細胞またはｉｉｉ）工程（ａ）および（ｄ）の該細胞をＲＮＡでトランスフェクトする請求項２２記載の方法。
【請求項２４】
（ａ）野生型ＳＣＮ５Ａでトランスフェクトしたトランスジェニック動物を調製し；
（ｂ）該トランスジェニック動物のトランスジェニック細胞において第１の誘導Ｎａ$^+$電流を誘導し；
（ｃ）該第１の誘導Ｎａ$^+$電流を測定し；
（ｄ）突然変異ＳＣＮ５Ａでトランスフェクトしたトランスジェニック動物を調製し、ここに該突然変異ＳＣＮ５Ａは配列番号：４で示されるポリペプチドをコードし；
（ｅ）工程（ｄ）のトランスジェニック動物のトランスジェニック細胞において第２の誘導Ｎａ$^+$電流を誘導し；
（ｆ）該第２の誘導Ｎａ$^+$電流を測定し；
（ｇ）薬剤を工程（ｄ）のトランスジェニック動物に投与し；
（ｈ）工程（ｇ）の該トランスジェニック動物のトランスジェニック細胞において第３の誘導Ｎａ$^+$電流を誘導し；
（ｉ）該第３の誘導Ｎａ$^+$電流を測定し；ついで
（ｊ）該第３の誘導Ｎａ$^+$電流が該第２の誘導Ｎａ$^+$電流と比較して該第１の誘導Ｎａ$^+$電流により類似しているかまたはあまり類似していないかを判定することを含み、
ここに該第２の誘導Ｎａ$^+$電流よりも該第１の誘導Ｎａ$^+$電流により類似する該第３の誘導Ｎａ$^+$電流を生じる薬剤が薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を治療または予防するのに有用であることを特徴とする薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を治療または予防するのに有用である薬剤についてスクリーニングする方法。
【請求項２５】
ａ）突然変異ＳＣＮ５Ａ（ここに該突然変異ＳＣＮ５Ａは配列番号：４で示されるポリペプチドをコードする）を発現する細胞を浴用溶液に入れて電流を測定し；
ｂ）工程（ａ）の細胞において第１の誘導Ｎａ$^+$電流を誘導し；
ｃ）該第１の誘導Ｎａ$^+$電流を測定し；
ｄ）薬剤を工程（ｃ）の浴用溶液に添加し；
ｅ）工程（ｄ）の細胞において第２の誘導Ｎａ$^+$電流を誘導し；
ｆ）該第２の誘導Ｎａ$^+$電流を測定し；ついで
ｇ）該薬剤が該第１の誘導Ｎａ$^+$電流とは異なる該第２の誘導Ｎａ$^+$電流を生じるかを判

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

【請求項２６】

該細胞をトランスジェニック動物から得る請求項２５記載の方法。

【請求項２７】

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

【請求項２８】

ａ）突然変異ＳＣＮ５Ａでトランスフェクトしたトランスジェニック動物を調製し、ここに該突然変異ＳＣＮ５Ａは配列番号：４で示されるポリペプチドをコードし；

ｂ）工程（ａ）の該トランスジェニック動物のトランスジェニック細胞において第１の誘導Na^+電流を誘導し；

ｃ）該第１の誘導Na^+電流を測定し；

ｄ）薬剤を該トランスジェニック動物に投与し；

ｅ）工程（ｄ）の該トランスジェニック動物のトランスジェニック細胞において第２の誘導Na^+電流を誘導し；

ｆ）該第２の誘導Na^+電流を測定し；ついで

ｇ）該第２の誘導Na^+電流が該第１の誘導Na^+電流とは異なるかを判定し；

ここに異なる電流を生じる薬剤が配列番号：４で示されるポリペプチドをコードする遺伝子を含む個人にトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を誘導する危険性を示すことを特徴とするトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を誘導する危険性を示す薬剤をスクリーニングする方法。

【請求項２９】

（ａ）突然変異ＳＣＮ５Ａでトランスフェクトしたトランスジェニック動物を調製し、ここに該突然変異ＳＣＮ５Ａは配列番号：４で示されるポリペプチドをコードし；

（ｂ）薬剤を工程（ａ）のトランスジェニック動物に投与し；ついで

（ｃ）該薬剤が該トランスジェニック動物に薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を誘導したかを判定することを含むトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動を誘導する危険性を示す薬剤をスクリーニングする方法。

【請求項３０】

ａ）請求項１５記載の宿主細胞を準備し；

ｂ）試験すべき化合物の不存在下で配列番号：４で示されるタンパク質の活性を測定し；

ｃ）該宿主細胞と該化合物とを接触させ；ついで

ｄ）該化合物の存在下で該タンパク質の該活性を測定することを含み、

ここに工程（ｂ）で測定した活性と工程（ｄ）で測定した活性との間の差異が該化合物による調節を示すことを特徴とする配列番号：４で示されるタンパク質の活性を該化合物が調節できるかを判定する該化合物を試験する方法。

【請求項３１】

該宿主細胞をＲＮＡでトランスフェクトする請求項３０記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

発明の背景

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

【０００２】

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

ＬＱＴ１およびＫＣＮＥ１中の突然変異は、常染色体劣性様式で遺伝する表現型異常である聾と関連するＬＱＴＳ形態であるジャーベル・ランゲ・ニールセン症候群をも引起こす。

【０００３】

本発明は、ＳＣＮ５Ａ遺伝子中の変化ならびに該変化を検出するための方法に関する。本明細書中で用いる刊行物および他の材料は、発明の背景を説明し、または実施に関するさらなる詳細を供し、出典明示して本明細書の一部とみなし、簡便性のために、各々、添付する参考文献のリストにグループ化する。

本発明は、薬物誘導型トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動と関連しているＳＣＮ５Ａ遺伝子中およびその遺伝子産物中の変化、ならびにこれらの障害の診断および予防方法に指向される。これらの薬物誘導型の身体的障害は、試験すべき個人のＳＣＮ５Ａ遺伝子のＤＮＡ配列を分析し、そのＤＮＡ配列を正常遺伝子の公知のＤＮＡ配列と比較することによって、本発明により診断する。薬物誘導型トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動の予測により、医療実務者は、既存の医療療法を用いてこの障害を予防することができる。

【０００４】

心臓不整脈は、全自然死のほぼ１１％と概算される、病的状態および死亡の一般的な原因である（Ｋａｎｎｅｌ，１９８７；Ｗｉｌｌｉｃｈら，１９８７）。一般的に、生命を脅かす心室不整頻搏を患う個人の前症候的な診断および治療はほとんど存在せず、医療管理が実際には不整脈および死の危険性を増大する場合もある（Ｃａｒｄｉａｃ Ａｒｒｙｔｈｍｉａ Ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｒｉａｌ ＩＩ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｏｒｓ，１９９２）。これらの因子により、心臓不整脈の危険の高い個人の早期の検出および不整脈の予防は、優先順位が高いものとなっている。

【０００５】

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

【０００６】

先天性および後天性の両方の形態のＬＱＴが明らかにされている。後天性ＬＱＴおよび続発性の不整脈は、心臓虚血、徐脈ならびに低い血清カリウムまたはカルシウム濃度のごとき代謝異常から生じ得る（Ｚｉｐｅｓ，１９８７）。ＬＱＴは、抗生物質、抗ヒスタミン剤、全身麻酔を含む特定の薬物療法、および最も一般的には抗不整脈薬剤療法を用いた治療からも生じ得る（Ｚｉｐｅｓ，１９８７）。先天性形態のＬＱＴは、少なくとも５の異なる遺伝子中の突然変異から発生し得る。以前の研究においては、ＬＱＴ遺伝子座は染色体１１ｐ１５．５（ＫＶＬＱＴ１またはＬＱＴ１）（Ｋｅａｔｉｎｇら，１９９１ａ；Ｋｅａｔｉｎｇら，１９９１ｂ）、７ｑ３５－３６（ｚＨＥＲＧまたはＬＱＴ２）、３ｐ２１－２４（ＳＣＮ５ＡまたはＬＱＴ３）（Ｊｉａｎｇら，１９９４）にマッピ

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

【０００７】

現在、ＬＱＴの前症候診断は心電図のＱＴ間隔の延長に基づいている。０．４４秒よりも長いＱＴｃ（心臓の速度に対して補正したＱＴ間隔；Ｂａｚｚｅｔｔ，１９２０）は、伝統的にその個人が患っていると分類している。しかしながら、大部分のＬＱＴ患者は心電図を有していない若年であるか、さもなくば健全な個人である。さらに、遺伝的研究により、ＱＴｃは感受性でも特異的でもないことが示されている（Ｖｉｎｃｅｎｔら，１９９２）。遺伝子キャリアーおよび非キャリアーについてのＱＴｃ間隔のスペクトルは重複し、誤分類に通じる。非キャリアーはＱＴ延長間隔を有し得、患っていると診断される。逆に言えば、≦０．４４秒のＱＴｃ間隔を有するＬＱＴ遺伝子キャリアーも存在するが、なお不整脈について危険性の高い状態にある。正確な前症候診断は、ＬＱＴの有効な遺伝子－特異的な治療のために重要である。

【０００８】

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

【０００９】

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

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

【００１０】

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

【００１１】

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

【００１２】

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

【００１３】

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

ｓｋｉら，１９９７ｂ）。
【００１４】
発明の概要
本発明は、薬物誘導型トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動と関連付けられたＳＣＮ５Ａ中の１の突然変異に指向される。
本発明の１の態様において、ＳＣＮ５Ａ中の特定の突然変異とトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動との関連を提供する。
【００１５】
本発明の第２の態様において、薬物誘導型トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に感受性の対象を早期に診断するためのＳＣＮ５Ａ遺伝子の解析を提供する。当該診断法には、試験すべき個人のＳＣＮ５ＡのＤＮＡ配列を解析し、ついで天然の非変異型遺伝子のＤＮＡ配列とそれを比較することが含まれる。薬物誘導型トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対する素因を予想する能力により、医師は、適当な薬物療法を指示することによって感受性患者におけるこれらの症状を予防することが可能となるであろう。
【００１６】
本発明は、個人を薬物誘導型トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に罹りやすくするＳＣＮ５Ａ突然変異を有する個人におけるトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を治療または予防するのに使用し得る薬剤候補をスクリーニングする方法にも指向される。本発明のもう１の態様は、薬剤をＳＣＮ５Ａ中に突然変異を有する個人に投与した場合にトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動の発生を生じるかを判定する該薬剤のスクリーニング方法である。
【００１７】
発明の詳細な説明
本発明は、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に患者を罹りやすくするであろうＳＣＮ５Ａ中の特定の突然変異を患者が有するかを判定することに指向される。さらに、本発明は、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を引起こすこのＳＣＮ５Ａ遺伝子変異型の存在ついてヒトをスクリーニングする方法に指向される。ここでは、この罹りやすさはより早期（すなわち、病徴が現れる前に）かつより明確に検出し得るため、突然変異を有すると同定された個人について、より良好な治療選択肢が利用可能であろう。本発明は、トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を治療または予防するのに有用な薬剤をスクリーニングする方法にも指向される。
【００１８】
本発明は、特定の突然変異を同定するためのＳＣＮ５Ａ遺伝子をスクリーニングする方法を提供する。さらに、かかる方法は、ＳＣＮ５Ａ遺伝子の一部分を増幅する工程を含み得、さらに、該ＳＣＮ５Ａの一部分を増幅するためのプライマーである１セットのポリヌクレオチドを得る工程を含み得る。当該方法は、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対する素因の診断または予測のいずれかに使用するための突然変異を同定するのに有用である。
【００１９】
さらに、本発明は、トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を治療または予防するのに有用な薬剤を同定するための薬剤候補をスクリーニングする方法に指向される。薬剤スクリーニングは、卵母細胞、哺乳動物細胞またはトランスジェニック動物のごとき細胞中で突然変異ＳＣＮ５Ａを発現させ、ついでＳＣＮ５Ａナトリウムチャネルに対する薬剤候補の効果をアッセイすることによて行う。その効果を野生型ＳＣＮ５Ａナトリウムチャネル活性と比較する。
【００２０】
さらに、本発明は、突然変異ＳＣＮ５Ａを有する個人に特定の薬剤を投与した場合に当該個人にトルサード・デ・ポワンツまたは心室細動が生じるかを判定する薬剤をスクリーニングする方法にも指向される。
【００２１】

最後に、本発明は、化合物が突然変異ＳＣＮ５Ａタンパク質の活性を調節し得るかを判定するために当該化合物を試験する方法に指向される。

【００２２】

ＱＴ延長症候群は、心臓不整脈、具体的にはトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動により突然死を引起こす遺伝性または後天性の疾患である。ＬＱＴは以前に４の遺伝子座：染色体１１ｐ１５．５上のＫＶＬＱＴ１、７ｑ３５－３６上のＳＣＮ５Ａ、３ｐ２１－２４上のＳＣＮ５Ａおよび染色体２１ｑ２２．１－２２．２上のＫＣＮＥ１、にマッピングされた。

【００２３】

ＳＣＮ５Ａ遺伝子中の変化は、Na^+チャネルの多くの身体的特徴における変化を生じ得る。これらには、限定されるものではないが、イオン特異性、不活化の長さ、電流の大きさ、活性化または不活化の電位依存性、動態力学、活性化するための電位閾値が含まれる。先行技術は、変化したＳＣＮ５Ａの存在の結果として変化した活性を有する種々の身体的特徴を教示している。これらの変化の幾つかを論じている刊行物には、Ｖｅｌｄｋａｍｐら（２０００）、Ｋａｍｂｏｕｒｉｓら（２０００）、Ｄｅｓｃｈｅｎｅｓら（２０００）、Ｒｏｏｋら（１９９９）、Ａｎｔｚｅｌｅｖｉｔｃｈら（１９９９）、Ｃｏｕｄｅｒｃら（１９９９）およびＷａｎｇら（１９９６）が含まれる。これらの身体的特徴は調節し得る。例えば、それらを測定可能な量で、ある種の薬剤での治療によって増大または低下し得る。突然変異ＳＣＮ５Ａチャネルを調節するであろう薬剤についてスクリーニングすることが望ましい。大部分の症例においては、突然変異ＳＣＮ５Ａチャネルがより野生型ＳＣＮ５Ａチャネルのように振る舞い、ゲノムが突然変異ＳＣＮ５Ａを含み、これらの薬剤で治療されるべき個人に有利な効果を生じるであろうように、突然変異ＳＣＮ５Ａチャネルを調節することが望ましいであろう。ある種の薬剤の不存在下では野生型ＳＣＮ５Ａチャネルと比較した場合に活性において何ら検出可能な差異を有していない突然変異ＳＣＮ５Ａチャネルの場合においては、野生型ＳＣＮ５Ａチャネルと比較した場合に突然変異ＳＣＮ５Ａチャネルの活性を調節しないであろう薬剤を見出すための突然変異ＳＣＮ５Ａの使用が望ましいであろう。

【００２４】

本発明の診断および予測方法によれば、野生型ＳＣＮ５Ａ遺伝子の変化が検出される。加えて、当該方法は、野生型ＳＣＮ５Ａ遺伝子を検出し、この遺伝子座の結果としての薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動の欠如を確認することによって行い得る。

【００２５】

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

【００２６】

ヒトを薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に罹りやすくするＳＣＮ５Ａ突然変異の存在は、ＳＣＮ５Ａ遺伝子の突然変異についてヒトのいずれかの組織を試験することによって確認し得る。例えば、生殖細胞系にＳＣＮ５Ａ突然変異を遺伝している個人は薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に罹りやすいであろう。このことは、個人の身体のいずれかの組織からのＤＮＡを試験することによって判定し得る。最も単純には、採血し、かかる血液の細胞からＤＮＡを抽出し得る。加えて、出生前診断は、ＳＣＮ５Ａ遺伝子の突然変異について胎児細胞、胎盤細胞または羊膜細胞を試験することによって行い得る。野生型ＳＣＮ５Ａ対立遺伝子の変化は、本明細書中に論じるいずれかの手段によって検出し得る。

【００２７】

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

【００２８】

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

【００２９】

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

【００３０】

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

【００３１】

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

【００３２】

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

【００３３】

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

【００３４】

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

ブにハイブリダイズさせる。また、これらの核酸マイクロチップを用いて核酸－タンパク質相互作用を研究することも可能である。この技術を用いれば、突然変異の存在を判定しもしくは解析すべき核酸を配列決定することさえでき、あるいは関心の遺伝子の発現レベルを測定することができる。当該方法は、多くの、数千さえのプローブの同時の平行プロセシングのうちの１つであって、解析速度をおびただしく増大し得る。この技術を用いる幾つかの論文が発表されている。これらのうちの幾つかは、Ｈａｃｉａら，１９９６；Ｓｈｏｅｍａｋｅｒら，１９９６；Ｃｈｅｅら，１９９６；Ｌｏｃｋｈａｒｔら，１９９６；ＤｅＲｉｓｉら，１９９６；Ｌｉｐｓｈｕｔｚら，１９９５である。この方法は、乳ガン遺伝子ＢＲＣＡ１中の突然変異につき人々をスクリーニングするためにすでに用いられている（Ｈａｃｉａら，１９９６）。この新たな技術は、Ｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ Ｎｅｗｓ中のｎｅｗ ａｒｔｉｃｌｅ（Ｂｏｒｍａｎ，１９９６）にレビューされており、論説の主題になっている（Ｅｄｉｔｏｒｉａｌ，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１９９６）。Ｆｏｄｏｒ（１９９７）も参照されたい。

【００３５】

候補遺伝子座中の突然変異についての最も完成した試験は、患者からのゲノムＳＣＮ５Ａ配列と対照集団からのものとを直接比較することである。別法として、例えばＰＣＲによって増幅した後にメッセンジャーＲＮＡを配列決定し得、それによって候補遺伝子のエキソン構造を決定する必要性がなくなる。

【００３６】

野生型遺伝子の変化は、野生型ＳＣＮ５Ａタンパク質の変化をスクリーニングすることによっても検出し得る。例えば、ＳＣＮ５Ａと免疫反応性のモノクローナル抗体を用いて組織をスクリーニングし得る。血族抗原の欠如は突然変異を示すであろう。突然変異対立遺伝子の産物に特異的な抗体を用いて、突然変異遺伝子産物を検出することもできるであろう。かかる免疫アッセイは、当該技術分野で知られているいずれの簡便な形式でも行い得る。これらには、ウエスタン・ブロット、免疫組織化学アッセイおよびＥＬＩＳＡアッセイが含まれる。変化したＳＣＮ５Ａタンパク質を検出するいずれかの手段を用いて、野生型ＳＣＮ５Ａ遺伝子の変化を検出し得る。タンパク質結合性判定のごとき機能性アッセイを用い得る。加えて、ＳＣＮ５Ａの生化学的機能を検出するアッセイを用い得る。

【００３７】

突然変異ＳＣＮ５Ａ遺伝子または遺伝子産物は、血清、便、尿および唾液のごとき他のヒト身体試料中にも検出し得る。組織中の突然変異遺伝子または遺伝子産物を検出するための前記で論じたものと同じ技術は、他の身体試料にも適用し得る。かかる身体試料をスクリーニングすることによって、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対する素因について単純な早期診断を達成し得る。

【００３８】

本発明のプライマー・ペアは、ＰＣＲを用いる特定のＳＣＮ５Ａ対立遺伝子のヌクレオチド配列を決定するのに有用である。ＳＣＮ５Ａに対する一本鎖ＤＮＡプライマーのペアは、遺伝子自体の増幅ＤＮＡ合成を開始するために、ＳＣＮ５Ａ遺伝子の中またはそれを取り囲む配列にアニーリングし得る。対立遺伝子特異的プライマーも用い得る。かかるプライマーは特定のＳＣＮ５Ａ突然変異対立遺伝子にのみアニーリングし、したがって、鋳型としての突然変異対立遺伝子の存在下でのみ産物を増幅するであろう。

【００３９】

野生型ＳＣＮ５Ａ遺伝子を有する個人が薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に罹りやすくないことが知られている。しかしながら、ＳＣＮ５Ａ遺伝子産物の機能を妨害する特異的突然変異が薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対する素因に関与していることを本明細書中に示す。したがって、機能損失または変化した機能を有するタンパク質を産生する変化した（または突然変異）ＳＣＮ５Ａ遺伝子の存在は、トルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対する素因を直接的に引起こす。ＳＣＮ５Ａ遺伝子突然変異を検出するために、生物試料を調製し、分析すべき対立遺伝子の配列と野生型対立遺伝子の配列との間の相異につき分析する。突然変異ＳＣＮ５Ａ対立遺伝

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

【００４０】

定義

本発明は以下の定義を用いる。

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

【００４１】

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

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

【００４２】

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

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

【００４３】

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

【００４４】

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

【００４５】

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

【００４６】

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

【００４７】

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

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

【００４８】

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

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

【００４９】

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

【００５０】

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

【００５１】

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

【００５２】

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

【００５３】

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

【００５４】

本発明による核酸は、配列番号：１および３に示す配列とは異なる配列を含み得、なお、配列番号：２および４に示すのと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし得る。すなわち、本発明の核酸には、遺伝コードの結果として縮重となる配列が含まれる。

【００５５】

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

【００５６】

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

【００５７】

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

【００５８】

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

【００５９】

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

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

【００６０】

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

【００６１】

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

【００６２】

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

【００６３】

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

に生成する場合には、グリコシル化のごとき天然の翻訳後プロセシングを欠き得る。別法として、本発明は、ＳＣＮ５Ａポリペプチドの配列変異型、対立遺伝子または誘導体であるポリペプチドにも指向される。かかるポリペプチドは、１またはそれを超えるアミノ酸の１またはそれを超える付加、置換、欠失または挿入によって、配列番号：２または配列番号：４に記載のものとは異なるアミノ酸配列を有し得る。好ましいかかるポリペプチドはＳＣＮ５Ａ機能を有する。

【００６４】

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

【００６５】

ある種のアミノ酸は、例えば、抗体の抗原結合領域または基質分子上の結合部位もしくはＳＣＮ５Ａポリペプチドと相互作用するタンパク質上の結合部位のごとき、構造との相互作用結合能力のかなりの消失なしに、タンパク質構造中で他のアミノ酸に置換し得る。タンパク質の生物学的機能活性を決めるのはタンパク質の相互作用能力および性質であるため、ある種のアミノ酸置換をタンパク質配列およびその基礎をなすＤＮＡコード配列中に作成し得、それにもかかわらず、同様な特性を有するタンパク質を得ることができる。かかる変化を作成することにおいて、アミノ酸のハイドロパシー・インデックスを考慮し得る。タンパク質に相互作用的生物機能を付与することにおける疎水性アミノ酸インデックスの重要性は、一般的に当該技術分野で理解されている（ＫｙｔｅおよびＤｏｏｌｉｔｔｌｅ，１９８２）。別法として、アミノ酸のようなものの置換は、親水性に基づいて効果的に作成し得る。タンパク質の相互作用的生物機能を付与することにおける親水性の重要性は、一般的に当該技術分野で理解されている（米国特許第４，５５４，１０１号）。ポリペプチドを設計することにおいて疎水性インデックスまたは親水性を用いることは、米国特許第５，６９１，１９８号にさらに論じられている。

【００６６】

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

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

【００６７】

ペプチド模倣物または模倣物なる語は、ＳＣＮ５Ａポリペプチドの本質的な生物活性を有する物質をいうことを意図する。ペプチド模倣物は、タンパク質二次構造のエレメントを模倣するペプチド含有分子とし得る（Ｊｏｈｎｓｏｎら，１９９３）。ペプチド模倣物の使用の背後に存在する根本的理由は、主として、タンパク質のペプチド骨格が、抗体と抗原、酵素と基質または足場タンパク質のもののごとき、分子相互作用を促進するように、アミノ酸側鎖を方向付けるために存在することである。ペプチド模倣物は、天然分子と同様な分子相互作用を許容するように設計される。模倣物は、必ずしもペプチドでなくてもよいが、それは天然ＳＣＮ５Ａポリペプチドの本質的な生物活性を保持しているであろう。

【００６８】

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

【００６９】

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

【００７０】

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

【００７１】

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

【００７２】

ＳＣＮ５Ａをコードするポリヌクレオチド配列からの、少なくとも約８ヌクレオチド、通常少なくとも約１５ヌクレオチドを有し、かつ約９ｋｂよりも小さい、通常約１．０ｋｂよりも小さいポリヌクレオチド配列の部分が、プローブとして好ましい。したがって、この定義には、８、１２、１５、２０、２５、４０、６０、８０、１００、２００、３００、４００または５００ヌクレオチドのプローブ、またはこれらの値の範囲内のいずれかの数（例えば、９、１０、１１、１６、２３、３０、３８、５０、７２、１２１他のヌクレオチド）のヌクレオチドを有するプローブ、あるいは５００を超えるヌクレオチドを有するプローブが含まれる。該プローブを用いて、ＳＣＮ５ＡをコードするｍＲＮＡが細胞または組織中に存在するかを判定することもできる。先行技術に存在ｓるプローブを含まない。すなわち、本発明は、配列番号：１または配列番号：３由来の少なくとも８のヌクレ

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

【００７３】

同様な考察およびヌクレオチド長は、ＳＣＮ５Ａ遺伝子の全体または一部分の増幅に用い得るプライマーにも適用し得る。したがって、プライマーについての定義には、８、１２、１５、２０、２５、４０、６０、８０、１００、２００、３００、４００、５００ヌクレオチドのプライマー、またはこれらの値の範囲内のいずれかの数のヌクレオチド（例えば、９、１０、１１、１６、２３、３０、３８、５０、７２、１２１他のヌクレオチド）を有するプライマー、あるいは５００を超えるヌクレオチド、あるいは５００ないし９００のいずれかの数のヌクレオチドを有するプライマーが含まれる。このプライマーを用いて、ＳＣＮ５ＡをコードするｍＲＮＡが細胞または組織中に存在するか否かを判定することもできる。本発明は、ＳＣＮ５Ａ遺伝子を増幅するための、ＳＣＮ５Ａ遺伝子座由来の少なくとも８のヌクレオチドを有する全ての新規なプライマー、その相補体または機能的に等価な核酸配列が含まれる。本発明は、先行技術に存在するプライマーを含むものではない。すなわち、本発明は、少なくとも８ヌクレオチドを有する全てのプライマーを含むが、但し、先行技術に存在するプライマーは含まない。

【００７４】

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

【００７５】

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

【００７６】

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

【００７７】

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

する。相同ポリペプチドは、２またはそれを超えるＳＣＮ５Ａポリペプチド配列間またはＳＣＮ５Ａと関連タンパク質との配列の間の融合物とし得る。同様にして、誘導タンパク質の特性または活性の組合せを示すであろう異種融合物を構築し得る。例えば、リガンド－結合性のまたは他のドメインは、異なる新たな融合ポリペプチドまたはフラグメント間で“交換”し得る。かかる相同または異種の融合ポリペプチドは、例えば、変化した強さまたは特異性の結合性を示し得る。融合パートナーには、免疫グロブリン、細菌β－ガラクトシダーゼ、ｔｒｐＥ、プロテインＡ、β－ラクタマーゼ、アルファ・アミラーゼ、アルコール・デヒドロゲナーゼおよび酵母アルファ接合因子が含まれる。Ｇｏｄｏｗｓｋｉら，１９８８を参照されたい。

【００７８】

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

【００７９】

“タンパク質精製”とは、ＳＣＮ５Ａをコードする組換え核酸で形質転換した細胞からのごとき、他の生物材料からＳＣＮ５Ａポリペプチドを単離するための種々の方法をいい、当該技術分野でよく知られている。例えば、かかるポリペプチドは、例えば本発明によって提供される抗体、を用いた免疫アフィニティー・クロマトグラフィーによって精製し得る。タンパク質精製の種々の方法は当該技術分野でよく知られており、Ｄｅｕｔｓｃｈｅｒ，１９９０およびＳｃｏｐｅｓ，１９８２に記載されているものが含まれる。

【００８０】

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

【００８１】

ＳＣＮ５Ａタンパク質は、その天然状態でそれに付随する天然の夾雑物からそれを分離した場合には、天然に関連するコンポーネントを実質的に含まない。したがって、化学合成したか、またはそれからそれが天然に生じる細胞とは異なる細胞系で合成したポリペプチドは、その天然に関連するコンポーネントを実質的に含まないであろう。タンパク質は、当該技術分野でよく知られているタンパク質精製技術を用いて、単離することによって天然に関連するコンポーネントを実質的に含まないものとし得る。

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

【００８２】

“組換え核酸”とは、天然に発生しない、または配列の２の他の分離したセグメントの人工的組合せによって生成した核酸である。この人工的組み合わせは、しばしば、化学合成法、または例えば遺伝子工学技術による核酸の単離セグメントの人工的な操作のいずれかによって行う。かかるものは、通常、コドンを、同一または保存的アミノ酸をコードする縮重コドンで置換えるために行われ、一方、典型的には配列認識部位を導入するかまたは除去する。別法として、目的の機能の核酸セグメントを一緒に結合して、目的の機能組み

合わせを生成するためにもそれを行う。

【００８３】

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

“実質的ホモロジーまたは類似性” 他の核酸（またはその相補鎖）と（適当なヌクレオチドの挿入または欠失を有して）最適に並べた場合に、ヌクレオチド塩基の少なくとも約６０％、通常は少なくとも約７０％、より通常には少なくとも約８０％、好ましくは少なくとも約９０％、およびより好ましくは少なくとも約９５－９８％のヌクレオチド塩基にヌクレオチド配列の同一性が存在する場合には、核酸またはそのフラグメントは、もう１のものに“実質的に相同である”（“または実質的に類似である”）。

【００８４】

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

【００８５】

プログラム－ｂｌａｓｔｎ
マトリックス－０ ＢＬＯＳＵＭ６２
対合に対するリワード－ ０ または １ （１）
誤対合に対するペナルティー－０，－１，－２ または－３ （－２）
オープンギャップ・ペナルティー－ ０，１，２，３，４ ｏｒ ５ （５）
伸長ギャップ・ペナルティー－０または１ （１）
ギャップ ｘ_ドロップオフ－０または５０ （５０）
予測－１０

【００８６】

種々の他の結果と一緒に、このプログラムは完全鎖を横切る（ａｃｒｏｓｓ）または対合する２の核酸の領域を横切る％同一性を示す。プログラムは、比較する２の鎖のアライメントおよび同一性を結果の一部として示す。鎖が同じ長さのものである場合には、同一性は核酸の完全長を横切って計算されるであろう。鎖が等しくない長さのものである場合には、短い方の核酸の長さを用いるべきである。核酸がそれらの配列の部分を全く同様に横切るがそれらの配列の残りを異なって横切る場合には、ｂｌａｓｔｎプログラム“ＢＬＡＳＴ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ”は類似部分のみを横切る同一性を示し、これらの部分は別個に報告される。本明細書中のホモロジーを決定する目的について、％ホモロジーとは比較する２の配列のうちの短い方をいう。いずれか１の領域が異なる％同一性で異なるアライメントで示される場合には、最高のホモロジーを与えるアライメントを用いるべきである。平均化は、配列番号：５および６のこの例におけるごとく行う。

【００８７】

【化１】

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

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

【００８８】

プログラム“ＢＬＡＳＴ ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ”は、選択したパラメータに依存してこれら２の核酸の異なるアライメントを示す。例えば、配列番号：５および６を比較するために４セットのパラメータを選択し（ギャップ ｘ＿ドロップオフは全ケースにつき５０とした）、結果を表１に示す。表１に示すごとく選択したパラメータのセットのいずれもが、必ずしもこれらの配列を比較するためのパラメータの最良のセットであるとは限らないことは注意すべきである。％ホモロジーは、同一性を示す各領域につき、領域内の短い方の鎖の塩基のフラクションとその領域についての％同一性を乗じ、これら全てを一緒に加算することによって算出される。例えば、表１に示す第１セットのパラメータを用いれば、配列番号：５が短い方の配列（６３塩基）であり、同一性の２の領域が示される。第１のものは配列番号：６に対して９２％同一性を有する配列番号：５の塩基４－２９（２６塩基）を含み、第２のものは配列番号：６に対して１００％同一性を有する配列番号：５の塩基３９－５９（２１塩基）を含む。塩基１－３、３０－３８および６０－６３（１６塩基）は、配列番号：６といずれかの同一性を有すると示されていない。％ホモロジーは：（２６／６３）（９２）＋（２１／６３）（１００）＋（１６／６３）（０）＝７１．３％ホモロジーとして算出される。示した各４セットのパラメータを用いて算出したホモロジーの％を表１に掲載する。他の幾つかのパラメータの組み合わせも可能であるが、それらは簡潔性のために掲載しない。各セットのパラメータが異なる算出％ホモロジーとなることが示されている。最高％ホモロジーを与える結果を用いるべきであるため、ただこれら４セットのパラメータに基づいて、配列番号：５および６は８７．１％のホモロジーを有するというであろう。再度、他のパラメータを用いれば配列番号：５および６についてのより高いホモロジーを示し得るが、簡潔性のため、全ての可能な結果は示さない。

【００８９】

【表１】

表 1

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

【００９０】

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

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

【００９１】

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

【００９２】

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

【００９３】

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

【００９４】

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

（活性）の同様性は、野生型ＳＣＮ５Ａポリペプチドの活性よりもより高いものとなり得る。修飾ポリペプチドは、慣用技術を用いて合成するか、あるいは修飾核酸によってコードさせて、慣用技術を用いて産生させる。修飾核酸は慣用技術によって調製する。野生型ＳＣＮ５Ａ遺伝子機能と実質的に同様な機能を有する核酸は、前記した修飾タンパク質を産生する。

【００９５】

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

【００９６】

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

【００９７】

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

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

【００９８】

組換えまたは化学合成核酸の調製；ベクター、形質転換、宿主細胞

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

【００９９】

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

【０１００】

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

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

【０１０１】

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

【０１０２】

かかる発現ベクターは自律的に複製し得るが、それらは当該技術分野でよく知られている方法によって、宿主細胞のゲノムに挿入することによっても複製し得る。

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

【０１０３】

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

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

【０１０４】

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

【０１０５】

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

【０１０６】

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

【０１０７】

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

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

【０１０８】

使用方法：薬剤スクリーニング

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

、突然変異を有する個人にトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を誘導し得るものである。同様な実験を野生型ＳＣＮ５Ａを発現する細胞または動物に対して行い、試験薬剤が野生型の細胞または動物における誘導Na^+電流に対して同様な効果を有するかを判定し得る。同様な効果が示された場合には、突然変異ＳＣＮ５Ａを有する個人は野生型ＳＣＮ５Ａを有する個人よりも高い危険性を有するものとされないが、薬物処理した細胞または動物における誘導電流が非薬物処理細胞または動物細胞からの薬物処理した野生型細胞または動物におけるものよりも大きな量でもって異なる場合には、突然変異を有する個人は薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動の危険性の高い状態にある。

【０１０９】

本発明は、種々の薬剤スクリーニング技術のいずれかでＳＣＮ５Ａポリペプチドまたはその結合フラグメントを用いることによって化合物をスクリーニングするのに特に有用である。

かかる試験に用いるＳＣＮ５Ａポリペプチドまたはフラグメントは、溶液中に遊離しているか、固体支持体に固定化されているか、または細胞表面に結合させるかのいずれかとし得る。薬剤スクリーニングの１の方法は、好ましくは競合結合アッセイで、ポリペプチドまたはそのフラグメントを発現している組換えポリヌクレオチドで安定して形質転換した真核生物または原核生物の宿主細胞を用いる。生存可能または固定化形態のかかる細胞は、標準結合アッセイに用い得る。例えば、ＳＣＮ５Ａポリペプチドまたはフラグメントと試験する剤との間の複合体の形成を測定し得、またはＳＣＮ５Ａポリペプチドまたはフラグメントと公知のリガンドとの間の複合体の形成が試験する剤によって妨害される程度を調べることができる。

【０１１０】

かくして、本発明は、かかる剤とＳＣＮ５Ａポリペプチドまたはそのフラグメントとを接触させて、当該技術分野でよく知られている方法によって、（ｉ）剤とＳＣＮ５Ａポリペプチドまたはフラグメントとの間の複合体の存在について、または（ｉｉ）ＳＣＮ５Ａポリペプチドまたはフラグメントとリガンドとの間の複合体の存在についてアッセイすることを含む薬剤をスクリーニングする方法を提供する。かかる競合結合アッセイにおいては、ＳＣＮ５Ａポリペプチドまたはフラグメントは典型的には標識する。遊離ＳＣＮ５Ａポリペプチドまたはフラグメントは、タンパク質：タンパク質複合体で存在するものから分離し、遊離（すなわち非複合体形成）標識の量は、各々、ＳＣＮ５Ａに対して試験すべき剤の結合性またはＳＣＮ５Ａ：リガンド結合性のその妨害の測定値である。また、遊離よりむしろ、結合したＳＣＮ５Ａの量を測定することもできる。また、ＳＣＮ５Ａよりむしろ、リガンドを標識し、試験すべき薬剤の存在または不存在下でＳＣＮ５Ａに結合するリガンドの量を測定することも可能である。

【０１１１】

薬剤スクリーニングのもう１つの技術は、ＳＣＮ５Ａポリペプチドに対して好適な結合アフィニティーを有する化合物の高処理量スクリーニングを提供し、Ｇｅｙｓｅｎ（国際公開 ＷＯ８４／０３５６４）に詳記されている。簡単に述べると、多数の異なる小ペプチド試験化合物を、プラスチック・ピンまたは他の表面のごとき固体基体上で合成する。ペプチド試験化合物をＳＣＮ５Ａポリペプチドと反応させ、洗浄する。ついで、結合したＳＣＮ５Ａポリペプチドを当該技術分野でよく知られている方法によって検出する。

【０１１２】

精製ＳＣＮ５Ａは、前記した薬剤スクリーニング技術で使用するためのプレート上に直接コートし得る。しかしながら、ポリペプチドに対する非－中和抗体を用いて抗体を捕捉して、固相上にＳＣＮ５Ａポリペプチド固定化し得る。

本発明は、ＳＣＮ５Ａポリペプチドに特異的に結合することができる中和抗体を、ＳＣＮ５Ａポリペプチドまたはそのフラグメントに結合する試験化合物と競合させる競合薬剤スクリーニングアッセイの使用をも考慮している。この様にして、抗体を用いて、ＳＣＮ５Ａポリペプチドの１またはそれを超える抗原決定基を共有するいずれかのペプチドの存在を検出し得る。

【０１１３】
本発明のポリペプチドは、コンビナトリアル・ライブラリー技術の結果として開発された化合物をスクリーニングするのにも用い得る。コンビナトリアル・ライブラリー技術は、潜在的な膨大な数の異なる物質をポリペプチドの活性を調節する能力について膨大な数の異なる物質を試験する有効な方法を提供するｌ。かかるライブラリーおよびその使用は当該技術分野で知られている。ポリペプチドライブラリーの使用が好ましい。例えば、ＷＯ９７／０２０４８号を参照されたい。
【０１１４】
簡単には、ポリペプチドの活性を調節させる物質をスクリーニングする方法には、好適な反応培地中で１またはそれを超える試験物質をポリペプチドと接触させ、処理したポリペプチドの活性を試験し、その活性を試験物質または物質群で処理していない匹敵する反応培地中のポリペプチドの活性と比較することを含み得る。処理ポリペプチドと非処理ポリペプチドとの間の活性の差は、関連試験物質または物質群の調節効果の暗示である。
【０１１５】
活性の調節についてスクリーニングする前、ならびにしている間に、試験物質を、例えば、酵母２－ハイブリッド系（例えば、Ｂａｒｔｌｅら，１９９３；ＦｉｅｌｄｓおよびＳｏｎｇ，１９８９；ＣｈｅｖｒａｙおよびＮａｔｈａｎｓ，１９９２；Ｌｅｅら，１９９５）で、ポリペプチドと相互作用する能力についてスクリーニングし得る。この系は、ポリペプチドの活性を調節する実際の能力について物質を試験する前の粗いスクリーニングとして用い得る。別法として、該スクリーニングを用いて、ＳＣＮ５Ａ特異的結合パートナーへの結合性について試験物質をスクリーニングし、またはＳＣＮ５Ａポリペプチドの模倣物を見出すことができるであろう。
【０１１６】
ポリペプチド活性を調節またはそれに影響する物質を同定した後に、その物質をさらに調べ得る。さらに、それは、調製物、すなわち製造物または処方、あるいは医薬、医薬組成物または薬剤のごとき組成物で製造および／または使用し得る。これらは、個人に投与し得る。
【０１１７】
かくして、本発明は、ポリペプチド活性のモジュレーターとして核酸分子を用いて同定される物質のみならず、本明細書中に開示するものと一致して、かかる物質を含む医薬組成物、医薬、薬剤または他の組成物、かかる物質を含むかかる組成物を投与することを含む方法、かかる組成物を、例えば薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を治療する（予防的治療をも含み得る）ために患者に投与することを含む方法、例えば薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を治療するために、投与する組成物の製造におけるかかる物質の使用、ならびに、かかる物質と医薬上許容される賦形剤、ビヒクルまたは担体、および所望により他の成分とを混合することを含む医薬組成物の製造方法をも包含する種々の態様に及ぶ。
【０１１８】
ポリペプチド機能のモジュレーターとして同定した物質は、本来、ペプチドまたは非－ペプチドとし得る。非－ペプチド“小分子”はしばしば多くのイン・ビボ（ｉｎ ｖｉｖｏ）医薬用途に好ましい。したがって、（特に、ペプチドの場合）物質の模倣物または擬似物を医薬用途に設計し得る。
【０１１９】
公知の医薬上有効な化合物に対する模倣物の設計は、“リード”化合物に基づく医薬の開発の公知のアプローチである。このことは、有効化合物が合成することが困難であるか高価となる場合、あるいはそれが特定の投与方法に好適でない場合（例えば純粋なペプチドは、それが消化管中のプロテアーゼによって迅速に分解されがちなため口腔組成物に好適でない有効剤である）に、このことは望ましい。模倣物の設計、合成および試験は、一般的に、標的特性について多数の分子をランダムにスクリーニングすることを避けるために用いる。

【０１２０】
所定の標的特性を有する化合物から模倣物を設計するために一般的にとられる幾つかの工程が存在する。第１に、標的特性を決定することにおいて極めて重要および／または重要である化合物の特定の部分を決定する。ペプチドの場合においては、このことは、ペプチド中のアミノ酸残基を系統的に変化させることによって、例えば、順次各残基を置換することによって、行い得る。ペプチドのアラニン・スキャンを一般的に用いて、かかるペプチド・モチーフを清澄にする。化合物の活性領域を構成するこれらの部分または残基は、その“ファーマココア”として知られている。
【０１２１】
ファーマココアを見出したら、線源の範囲からのデータ、例えば分光光学的技術、ｘ線回折データおよびＮＭＲを用いてその物理学的特性、例えばステレオケミストリー、結合性、サイズおよび／または電荷、に従ってその構造をモデルする。コンピュータ解析、同様なマッピング（原子間の結合よりもむしろ、ファーマココアの電荷および／または容積をモデルする）および他の技術をこのモデリング工程で用い得る。
【０１２２】
このアプローチの変形において、リガンドとその結合パートナーの三次元構造をモデル化する。これは、リガンドおよび／または結合パートナーが結合の際に立体構造を変化させ、模倣物の設計においてこのことを考慮するモデルを許容する。
【０１２３】
ついで、ファーマココアを擬似する化学基が移植される鋳型分子を選択する。鋳型分子およびそれに移植した化学基は、模倣物が合成しやすく、薬理学的に許容できるようであり、かつイン・ビボ（ｉｎ ｖｉｖｏ）で分解されないが、リード化合物の生物活性は保持するように、慣用的に選択し得る。別法として、模倣物がペプチドに基づく場合には、ペプチドを環化させることによってさらなる安定性を達成し、その剛直性を増大し得る。ついで、このアプローチによって見出された模倣物または模倣物群は、それらが標的特性を有するか否か、またはそれらがそれをどの程度まで示すかを理解するためにスクリーニングし得る。ついで、さらなる最適化または修飾を行って、イン・ビボ（ｉｎ ｖｉｖｏ）または臨床試験用の１またはそれを超える最終模倣物に到達し得る。
【０１２４】
使用方法：核酸診断および診断キット
個人を薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に罹りやすくさせるＳＣＮ５Ａ対立遺伝子の存在を検出するために、血液のごとき生物試料を調製し、ＳＣＮ５Ａの感受性対立遺伝子の存在または不存在について分析する。薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対する素因または予測インジケーターとしての存在を検出するために、生物試料を調製し、ＳＣＮ５Ａの突然変異対立遺伝子の存在または不存在について分析した。これらの試験の結果および解釈情報を、試験個人へのコミュニケーションのためにヘルスケア・プロバイダーに戻す。かかる診断は、診断研究室によって行い得、あるいは別法として、診断キットを製造し、ヘルスケア・プロバイダーまたは自己診断用に個人に販売し得る。
【０１２５】
最初に、スクリーニング法には、関連ＳＣＮ５Ａ配列の増幅が含まれる。本発明のもう１つの好ましい態様において、該スクリーニング方法には非－ＰＣＲベースの戦略が含まれる。かかるスクリーニング方法には、当該技術分野でよく知られている二段階標識増幅法が含まれる。ＰＣＲおよび非－ＰＣＲベースのスクリーニング戦略は双方とも、高レベルの感度で標的配列を検出し得る。
【０１２６】
今日用いられている最もなじみ深い方法は標的増幅である。ここでは、標的核酸配列をポリメラーゼを用いて増幅する。ポリメラーゼ－作動増幅を用いる１つの特に好ましい方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）である。ポリメラーゼ連鎖反応および他のポリメラーゼ－作動増幅アッセイは、ポリメラーゼ－作動増幅サイクルの使用を通してコピー数で

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

【０１２７】

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

【０１２８】

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

【０１２９】

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

【０１３０】

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

【０１３１】

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

ン、ビオチン等のごとき）小さなリガンドがＳＣＮ５Ａを特異的に結合することができる核酸プローブに結合するという原理で働く。対立遺伝子特異的なプローブもこの例の範囲内に意図され、例示的な対立遺伝子特異的なプローブには、この開示の素因突然変異を包含するプローブが含まれる。

【０１３２】

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

【０１３３】

本発明の核酸プローブアッセイがＳＣＮ５Ａを検出することができる核酸プローブのカクテルを用いるであろうことも本発明の趣旨の範囲内に考慮される。かくして、細胞試料中のＳＣＮ５Ａの存在を検出するための１つの例において、遺伝子に相補的な１を超えるプローブを用い、特に、異なるプローブの数は択一的に２、３または５の異なる核酸プローブ配列である。もう１つの例において、患者のＳＣＮ５Ａ遺伝子配列中の突然変異の存在を検出するために、これらの遺伝子に相補的な１を超えるプローブを用い、ここにカクテルはＳＣＮ５Ａ中に変化を有する患者の集団中に同定される対立遺伝子－特異的突然変異に結合することができるプローブを含む。この具体例において、いずれの数のプローブをも用い得、好ましくはＬＱＴへの個人の素因を作るものとして同定された腫瘍遺伝子突然変異に対応するプローブが含まれるであろう。

【０１３４】

使用方法：ペプチド診断および診断キット

薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対する素因の存在は、野生型ＳＣＮ５Ａポリペプチドの変化に基づいても検出し得る。かかる変化は、慣用技術による配列分析によって判定し得る。より好ましくは、抗体（ポリクローナルまたはモノクローナル）を用いて、ＳＣＮ５Ａペプチド中の相異またはＳＣＮ５Ａペプチドの不存在を検出する。抗体を生起し、精製する技術は当該技術分野でよく知られており、いずれのかかる技術を選択して、本発明に特許請求した調製を達成し得る。本発明の好ましい具体例において、抗体は溶液からＳＣＮ５Ａタンパク質を免疫沈降させ、ならびにポリアクリルアミド・ゲルのウエスタンまたはイムノブロット上のこれらのタンパク質と反応するであろう。もう１つの好ましい具体例において、免疫組織化学技術を用いて、抗体はパラフィンまたは凍結組織切片中のＳＣＮ５Ａタンパク質を検出するであろう。

【０１３５】

ＳＣＮ５Ａまたはそれらの突然変異を検出する方法に関連する好ましい具体例には、モノクローナルおよび／またはポリクローナル抗体を用いる、サンドイッチアッセイ酵素結合免疫ソルベントアッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、イムノラジオメトリックアッセイ（ＩＲＭＡ）およびイムノ酵素アッセイ（ＩＥＭＡ）が含まれる。例示的なサンドイッチアッセイは出典明示して本明細書の一部とみなす、米国特許第４，３７６，１１０号および第４，４８６，５３０号中で、Ｄａｖｉｄらによって記載されている。

【０１３６】

使用方法：合理的薬剤設計

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

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

【０１３７】

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

【０１３８】

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

【０１３９】

使用方法：遺伝子治療

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

【０１４０】

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

【０１４１】
遺伝子治療は、一般的に受入れられている方法に従って、例えばＦｒｉｅｄｍａｎ（１９９１）またはＣｕｌｖｅｒ（１９９６）によって記載されているごとく、行われるであろう。患者からの細胞は、まず、前記した診断方法によって分析して、細胞中のＳＣＮ５Ａポリペプチドの産生を確認するであろう。発現制御エレメントに連結したＳＣＮ５Ａ遺伝子のコピーを含み、細胞の内側で複製することができるウイルスまたはプラスミド・ベクター（下記のさらなる詳細を参照されたい）を調製する。ベクターは細胞の内側で複製することができる。別法として、ベクターは複製欠損とすることができ、それは遺伝し治療において使用するためにヘルパー細胞中で複製する。米国特許第５，２５２，４７９号および国際公開ＷＯ９８／０７２８２号および米国特許第５，６９１，１９８号；第５，７４７，４６９号；第５，４３６，１４６号および第５，７５３，５００号に開示されているごとき、好適なベクターが知られている。ついで、ベクターを患者に注射する。トランスフェクトした遺伝子が各標的細胞のゲノムに不変的に取り込まれない場合には、治療を定期的に繰返さなければならない。

【０１４２】
当該技術分野で知られている遺伝子移入系は、本発明の遺伝子治療の実施に有用となり得る。これらには、ウイルスおよび非ウイルス移入法が含まれる。多種のウイルスが遺伝子移入ベクターまたは遺伝子移入ベクターを調製するための基礎として用いられており、それには、パポーバウイルス（例えば、ＳＶ４０，Ｍａｄｚａｋら，１９９２）、アデノウイルス（Ｂｅｒｋｎｅｒ，１９９２；Ｂｅｒｋｎｅｒら，１９８８；ＧｏｒｚｉｇｌｉａおよびＫａｐｉｋｉａｎ，１９９２；Ｑｕａｎｔｉｎら，１９９２；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら，１９９２；ＷｉｌｋｉｎｓｏｎおよびＡｋｒｉｇｇ，１９９２；Ｓｔｒａｔｆｏｒｄ－Ｐｅｒｒｉｃａｕｄｅｔら，１９９０；Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒら，１９９８）、ワクシニアウイルス（Ｍｏｓｓ，１９９２；Ｍｏｓｓ，１９９６）、アデノ随伴ウイルス（Ｍｕｚｙｃｚｋａ，１９９２；Ｏｈｉら，１９９０；ＲｕｓｓｅｌｌおよびＨｉｒａｔａ，１９９８）、ＨＳＶおよびＥＢＶを含むヘルペスウイルス類（Ｍａｒｄｏｌｓｋｅｅ，１９９２；Ｊｏｈｎｓｏｎら，１９９２；Ｆｉｎｋら，１９９２；ＢｒｅａｋｅｆｉｅｌｄおよびＧｅｌｌｅｒ，１９８７；Ｆｒｅｅｓｅら，１９９０；Ｆｉｎｋら，１９９６）、レンチウイルス（Ｎａｌｄｉｎｉら，１９９６）、シンドビスおよびセムリキ森林ウイルス（Ｂｅｒｇｌｕｎｄら，１９９３）、ならびに鳥類の（ＢａｎｄｙｏｐａｄｈｙａｙおよびＴｅｍｉｎ，１９８４；Ｐｅｔｒｏｐｏｕｌｏｓら，１９９２）、げっ歯類の（Ｍｉｌｌｅｒ，１９９２；Ｍｉｌｌｅｒら，１９８５；Ｓｏｒｇｅら，１９８４；ＭａｎｎおよびＢａｌｔｉｍｏｒｅ，１９８５；Ｍｉｌｌｅｒら，１９８８）およびヒト起源の（Ｓｈｉｍａｄａら，１９９１；Ｈｅｌｓｅｔｈら，１９９０；Ｐａｇｅら，１９９０；ＢｕｃｈｓｃｈａｃｈｅｒおよびＰａｎｇａｎｉｂａｎ，１９９２）レトロウイルスが含まれる。大部分のヒト遺伝子治療プロトコールは、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスも用いられているが、無力化したげっ歯類のレトロウイルスに基づいている。

【０１４３】
当該技術分野で知られている非ウイルス性遺伝子移入法には、リン酸カルシウム共沈法（Ｇｒａｈａｍおよびｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，１９７３；Ｐｅｌｌｉｃｅｒら，１９８０）；例えば、マイクロインジェクションのような機械的技術（Ａｎｄｅｒｓｏｎら，１９８０；Ｇｏｒｄｏｎら，１９８０；Ｂｒｉｎｓｔｅｒら，１９８１；ＣｏｓｔａｎｔｉｎｉおよびＬａｃｙ，１９８１）；リポソームを介する膜融合媒介移入（Ｆｅｌｇｎｅｒら，１９８７；ＷａｎｇおよびＨｕａｎｇ，１９８９；Ｋａｎｅｄａら，１９８９；Ｓｔｅｗａｒｔら，１９９２；Ｎａｂｅｌら，１９９０；Ｌｉｍら，１９９１）；ならびに直接ＤＮＡ取込みおよび受容体－媒介ＤＮＡ移入（Ｗｏｌｆｆら，１９９０；Ｗｕら，１９９１；Ｚｅｎｋｅら，１９９０；Ｗｕら，１９８９；Ｗｏｌｆｆら，１９９１；Ｗａｇｎｅｒら，１９９０；Ｗａｇｎｅｒら，１９９１；Ｃｏｔｔｅｎら，１９９０；Ｃｕｒｉｅｌら，１９９２；Ｃｕｒｉｅｌら，１９９１）。ウイルス－媒介遺伝子移入は、リポソーム・デリバリーを用いる直接イン・ビボ遺伝子移入と組合せて、ウイルス・ベクターを腫瘍細

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

【０１４４】

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

【０１４５】

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

【０１４６】

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

【０１４７】

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

【０１４８】

使用方法：ペプチド治療

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

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

【０１４９】

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

【０１５０】

使用方法：形質転換宿主

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

【０１５１】

ＳＣＮ５Ａ遺伝子突然変異と薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動との間の関連性の同定は、個人の早期の前症候性スクリーニングが薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動の発生について危険性のある個人を同定することを可能とする。かかる個人を同定するために、ＳＣＮ５Ａ対立遺伝子を、突然変異につき直接的にまたは対立遺伝子のクローニング後のいずれかにスクリーニングする。対立遺伝子はいずれかの適当な技術、限定されるものではないが、以下の方法のうちの一を用いて、正常な対立遺伝子からの核酸配列の差異の存在につき試験する：蛍光イン・サイチュ・ハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）、直接ＤＮＡ配列決定、ＰＦＧＥ分析、サザンブロット解析、一本鎖立体構造解析（ＳＳＣＰ）、連鎖解析、ＲＮアーゼ保護アッセイ、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、ドットブロット分析およびＰＣＲ－ＳＳＣＰ分析。また、最近開発された技術のＤＮＡマイクロチップ技術も有用である。例えば、（１）クローン化した対立遺伝子および正常ＳＣＮ５Ａ遺伝子の両方のヌクレオチド配列または適当なフラグメント（コード配列またはゲノム配列）を決定し、ついで比較する、あるいは、（２）ＳＣＮ５Ａ遺伝子または遺伝子フラグメントのＲＮＡ転写体を、試験すべき個人からの一本鎖全ゲノムＤＮＡにハイブリダイズさせ、得られたヘテロデュプレックスをリボヌクレアーゼＡ（ＲＮアーゼＡ）で処理し、変性ゲル上で泳動させていずれかの誤対合の位置を検出する。これらの方法のうちの２は以下の手順により行うことができる。

【０１５２】

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

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

【０１５３】

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

【０１５４】

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

【０１５５】

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

【０１５６】

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

【０１５７】

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

【０１５８】

医薬組成物および投与経路

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

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

【０１５９】

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

【０１６０】

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

【０１６１】

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

【０１６２】

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

【０１６３】

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

れるべき細胞において産生されるか、あるいはそれにターゲティングされる有効剤によって活性形態に変換するための前駆体形態でも投与し得る。例えば、ＥＰ ４２５，７３１ＡおよびＷＯ９０／０７９３６を参照されたい。

【０１６４】

実施例

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

【０１６５】

実施例１

薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツと関連するＳＣＮ５Ａ突然変異の同定

不整脈はしばしが薬物療法、最も一般的には抗不整脈薬を用いた治療から生じる。この不整脈の遺伝的基礎を決定するために、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に罹った個人を、公知の不整脈遺伝子中の突然変異についてスクリーニングした。スクリーニングされた遺伝子のうちの１はＳＣＮ５Ａであり、その配列を配列番号：１に示す。コードされるＳＣＮ５Ａタンパク質を配列番号：２に示す。この配列は、受託番号ＮＭ０００３３５としてＧｅｎＢａｎｋからも入手可能である。配列番号：３に示すＳＣＮ５Ａ５変異型が４のアフリカ系アメリカ人において見出され、そのうちの３はアミオダロン治療後に、１はブレビタルの注入後に不整脈を経験した。この変異型は２のさらなるアフリカ系アメリカ人においても見出された。６の個人はすべて、４の薬剤誘導型不整脈症例において悪化した心電図上のＱＴ間隔の延長を有していた。

【０１６６】

これらの個人において示された突然変異は、ＳＣＮ５Ａコード配列の塩基３３０８における変化であり、そこでは野生型のＣが突然変異版においてはＡとなっている。これは、この場所で野生型において見出されるセリンの代わりにアミノ酸残基１１０３にチロシンを有するコードタンパク質を生じる。このＳ１１０３変異型は試験したアフリカ系アメリカ人の１１％に存在したが、他の人種群においては見出されなかった。

【０１６７】

Ｓ１１０３Ｙ変異型は、５００Ｖ、室温にて一晩泳動した０．５×ＭＤＥゲル（Ｍｕｔａｔｉｏｎ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｅｎｈａｎｃｅｍｅｎｔ；ＦＭＣ ＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ）上で検出した。

【０１６８】

実施例２

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

配列番号：４のタンパク質をコードするＳＣＮ５Ａを有する個人は、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対して感受性である。薬剤は、例えば薬剤誘導効果を妨害するように突然変異ＳＣＮ５Ａに結合することによって、これらの効果を予防し得る。薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を予防することにおけるかかる薬剤の作用の機構が無関係なかかる薬剤をスクリーニングするためのアッセイを行い得る。

【０１６９】

Ａ．イン・ビトロ（ｉｎ ｖｉｔｒｏ）アッセイ

当該アッセイは、突然変異ＳＣＮ５Ａを発現する第１のセットの細胞を浴用溶液に入れ、ＳＣＮ５Ａナトリウムチャネルを横切る電流を誘導し、最初に誘導された電流を測定する。野生型ＳＣＮ５Ａを発現する第２のセットの細胞を別の浴用溶液に入れ、電流を誘導し、第２の誘導電流を測定する。薬剤を溶液中の第１のセットの細胞に添加し、電流を誘導し、第３の誘導電流を測定する。第１および第３の電流の測定に対する第２の電流の測定の順番は無関係である。薬剤が第１の誘導電流よりも第２の誘導電流により類似する第３の誘導電流を生じた場合には、当該薬剤は突然変異ＳＣＮ５Ａを有する個人を治療する薬

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

【０１７０】

Ｂ．イン・ビボ（ｉｎ ｖｉｖｏ）アッセイ

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

【０１７１】

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

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

【０１７２】

Ａ．イン・ビトロアッセイ

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

【０１７３】

Ｂ．イン・ビボアッセイ

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

【０１７４】

Ｃ．イン・ビボアッセイ

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

は実際に起こるが、野生型ＳＣＮ５Ａを発現する動物において起こらなければ、当該薬剤は突然変異の結果としてＳＣＮ５Ａ突然変異を有する個人にトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を誘導し得る。

【０１７５】

実施例４

ＳＣＮ５Ａに対するポリクローナル抗体の生成

ＳＣＮ５Ａコード配列のセグメントをイー・コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）中で融合タンパク質として発現させる。過剰発現されたタンパク質をゲル溶出によって精製し、それを用いてＨａｗｌｏｗおよびＬａｎｅ（１９８８）によって記載されている手法に類似する手法を用いてウサギおよびマウスに免疫接種する。この手法は種々のほかのタンパク質に対する抗体（Ａｂ）を生成することが示されている（例えば、Ｋｒａｅｍｅｒら，１９９３を参照されたい）。

【０１７６】

簡単には、ＳＣＮ５Ａコーディング配列のストレッチをプラスミドｐＥＴ５Ａ（Ｎｏｖａｇｅｎ，Ｉｎｃ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）中に融合タンパク質としてクローン化する。ＩＰＴＧで誘導した後に、予想分子量を有する融合タンパク質の過剰発現をＳＤＳ／ＰＡＧＥによって確認する。融合タンパク質は電気溶出によってゲルから精製する。ＳＣＮ５Ａ融合産物としてのタンパク質の同定は、Ｎ－末端のタンパク質配列決定によって確認する。つぎに、精製したタンパク質をウサギにおける免疫源として用いる。ウサギを完全フロイントアジュバント中の１００μｇのタンパク質で免疫接種し、３週間隔で２回、最初に不完全フロイントアジュバント中の１００μｇの免疫源を用い、つづいてＰＢＳ中の１００μｇの免疫源を用いて追加免疫する。抗体を含有する血清をその後２週間に採取する。

【０１７７】

この手法を繰返して、ＳＣＮ５Ａ遺伝子産物の突然変異形態に対する抗体を生成する。野生型ＳＣＮ５Ａに対する抗体と組み合わせたこれらの抗体を用いて、種々の組織および生物流体中の突然変異形態の存在および相対的レベルを検出する。

【０１７８】

実施例５

ＳＣＮ５Ａに対して特異的なモノクローナル抗体の生成

モノクローナル抗体は以下のプロトコールに従って生成する。よく知られているごとくグルタルアルデヒドまたはＥＤＣを用いてキーホール・リンペット・ヘモシアニンにコンジュゲートしたインタクトＳＣＮ５ＡまたはＳＣＮ５Ａペプチド（野生型または突然変異型）を含む免疫源をマウスに免疫接種する。

【０１７９】

該免疫源をアジュバントと混合する。各マウスには、１０ないし１００μｇの免疫源を４回注射し、４回目の注射の後にマウスから採血し、血清が抗原に対する抗体を含んでいるかを判定する。血清価はＥＬＩＳＡまたはＲＩＡによって測定する。免疫源に対する抗体の存在を示す血清を有するマウスをハイブリドーマ作成用に選抜する。

【０１８０】

免疫マウスから脾臓を取出し、単細胞懸濁液を調製する（ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ，１９８８を参照されたい）。細胞融合は、本質的にはＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ（１９７５）によって記載されているごとく行う。簡単には、Ｐ３．６５．３ミエローマ細胞（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）を、ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ（１９８８）によって記載されているごとくポリエチレングリコールを用いて免疫脾臓細胞と融合する。９６ウェル組織培養プレートに、細胞を2×10^{5}細胞／ウェルの密度で播く。増殖について個々のウェルを調べ、増殖しているウェルの上清を野生型または突然変異ＳＣＮ５Ａ標的タンパク質を用いるＥＬＩＳＡまたはＲＩＡによってＳＣＮ５Ａ特異的抗体の存在について試験する。陽性ウェル中の細胞を広げ、サブクローニングしてモノクローナル性を確立し、確認する

。
所望の特異性を有するクローンをマウス中で腹水としてまたは中空糸系において広げ、増殖させて、特徴付けおよびアッセイ開発に十分な量の抗体を生成する。
【０１８１】
実施例６
ＳＣＮ５Ａについてのサンドイッチアッセイ
モノクローナル抗体をプレート、チューブ、ビーズまたは粒子のごとき固体表面に結合させる。好ましくは、抗体は９６－ウェルＥＬＩＳＡプレートのウェル表面に結合させる。ＳＣＮ５Ａペプチド／タンパク質（野生型および突然変異型）を含有する１００μＬの試料（例えば、血清、尿、組織サイトゾル）を固相の抗体に添加する。その試料を室温にて２時間インキュベートする。つぎに、試料流体をデカンテーションし、固相を緩衝液で洗浄して結合しなかった物質を除去する。１００μＬの（ＳＣＮ５Ａペプチド／タンパク質上の異なる抗原決定基に対する）第２のモノクローナル抗体を固相に添加する。この抗体をディテクター分子（例えば、^{125}Ｉ、酵素、発蛍光団または発色団）で標識し、第２の抗体を有する固相を室温にて２時間インキュベートする。第２の抗体をデカンテーションし、その固相を緩衝液で洗浄して結合しなかった物質を除去する。
【０１８２】
試料中に存在するＳＣＮ５Ａペプチド／タンパク質の量に比例する結合標識の量を定量化する。野生型ＳＣＮ５Ａに対して特異的なモノクローナル抗体ならびにＳＣＮ５Ａ中に同定した各突然変異に対して特異的なモノクローナル抗体を用いて別のアッセイを行う。
【０１８３】
実施例７
ＳＣＮ５Ａ　Na^+チャネルに影響する薬剤をスクリーニングするアッセイ
ＳＣＮ５Ａが心臓ナトリウムチャネルを形成するという知見を用いれば、ここでこのチャネルに対して効果を有するであろう薬剤についてスクリーニングするためのアッセイを発明することができる。この遺伝子ＳＣＮ５Ａを卵母細胞または哺乳動物細胞にトランスフェクトし、前記のごとく発現させる。トランスフェクションは野生型または特異的に突然変異したＳＣＮ５Ａを用いて行う。トランスフェクションに用いる遺伝子が薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動に対する素因を引起こす突然変異を含む場合、野生型遺伝子でトランスフェクトしたものと比較して誘導電流における変化が見られる。薬剤候補をトランスフェクトした細胞の浴用溶液に添加して、誘導電流に対する薬剤候補の効果を試験する。野生型ＳＣＮ５Ａでトランスフェクトした細胞で見られる電流に近いように誘導電流を変化させる薬剤候補は、薬剤誘導型のトルサード・デ・ポワンツおよび心室細動を治療するのに有用である。
【０１８４】
本発明の好ましい態様の詳細に参照して本特許出願に本発明を開示したが、この開示は限定的な意味ではなく説明目的のものであって、当業者であれば、本発明の趣旨および添付した請求の範囲内で変形が容易に思い付くことは予想される。
【０１８５】
参考文献のリスト
Ａｌｔｓｃｈｕｌ ＳＦ，ら（１９９７）．Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２．
Ａｎａｎｄ，Ｒ（１９９２）．Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｃｏｍｐｌｅｘ Ｇｎｏｍｅｓ，（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ）．
Ａｎｄｅｒｓｏｎ ＷＦ，ら（１９８０）．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：５３９９－５４０３．
Ａｎｔｚｅｌｅｖｉｔｃｈ Ｃ ａｎｄ Ｓｉｃｏｕｒｉ Ｓ（１９９４）．Ｊ．Ａｍ．Ｃｏｌ．Ｃａｒｄ．２３：２５９－２７７．
Ａｎｔｚｅｌｅｖｉｔｃｈ Ｃ，ら（１９９９）．Ｊ．Ｅｌｅｃｔｒｏｃａｒｄｉｏｌ．３２（Ｓｕｐｐｌ．１）：［１５８－１６５．］

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

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

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

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

１４９－２１５６．
Ｍｅｔｚｇｅｒ Ｄ，ら（１９８８）．Ｎａｔｕｒｅ ３３４：３１－３６．
Ｍｉｆｆｌｉｎ ＴＥ（１９８９）．Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃｈｅｍ．３５：１８１９－１８２５．
Ｍｉｌｌｅｒ ＡＤ（１９９２）．［ＣＵＲＲ．］Ｔｏｐ．［ＭＩＣＲＯＢＩＯＬ．］Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５８：［１－２４．］
Ｍｉｌｌｅｒ ＡＤ，ら（１９８５）．［ＭＯＬ．ＣＥＬＬ．ＢＩＯＬ．］５：４３１－４３７．
Ｍｉｌｌｅｒ ＡＤ，ら（１９８８）．Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６２：４３３７－４３４５．
Ｍｏｄｒｃｌｉｐ（１９９１）．ＡＮＮ．ＲＥＶ．ＧＥＮＥＴ．］２５：２２９－２５３．
Ｍｏｍｂａｅｒｔｓ Ｐ，ら（１９９２）．Ｃｅｌｌ ６８：［８６９．］
Ｍｏｓｓ ＡＪおよびＭｃＤｏｎａｌｄ Ｊ（１９７１）．Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．２８５：９０３－９０４．
Ｍｏｓｓ ＡＪ，ら（１９９１）．Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ［８４］：１１３６－１１４４．
Ｍｏｓｓ Ｂ（１９９２）．Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．［ＭＩＣＲＯＢＩＯＬ．］Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５８：［２５－３８．］
Ｍｏｓｓ Ｂ（１９９６）．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：［１１３４１－１１３４８．］
Ｍｕｚｙｃｚｋａ Ｎ（１９９２）．Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．［ＭＩＣＲＯＢＩＯＬ．］Ｉｍｍｕｎｏｌ．［１５８］［：９７－１２９．］
Ｎａｂｅｌ ＥＧ，ら（１９９０）．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：［１２８５－１２８８．］
Ｎａｂｅｌ（１９９２）．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ［ＴＨＥＲ．］３：３９９－４１０．
Ｎａｌｄｉｎｉ Ｌ，ら（１９９６）．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７２：２６３－２６７．
Ｎｅｗｔｏｎ［ＣＲ，］ら（１９８９）．Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１７：２５０３－２５１６．
ＮｅｙｒｏｕｄＮ，ら（１９９７）．Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．１５：［１８６－１８９．］
Ｎｇｕｙｅｎ Ｑ，ら（１９９２）．ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １３：１１６－１２３．
Ｎｏｖａｃｋ ＤＦ，ら（１９８６）．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８３：５８６－５９０．
Ｏｈｉ Ｓ，ら（１９９０）．Ｇｅｎｅ ８９：２７９－２８２．
Ｏｒｉｔａ Ｍ，ら（１９８９）．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．［ＳＣＩ．］ＵＳＡ ８６：２７６６－２７７０．
Ｐａｇｅ ＫＡ，ら（１９９０）．［Ｊ］［ＶＩＲＯＬ．］６４：５２７０－５２７６．
Ｐｅｌｌｉｃｅｒ Ａ，ら（１９８０）．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２０９：１４１４－１４２２．
Ｐｅｔｒｏｐｏｕｌｏｓ ＣＪ，ら（１９９２）．Ｊ［ＶＩＲＯＬ．］６６：３３９１－３３９７．
Ｐｈｉｌｐｏｔｔ ＫＬ，ら（１９９２）．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５６：１４４８．
［ＱＵＡＮＴＩＮＢ，ＥＴ］ａｌ．（１９９２）．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：［２５８１－２５８４．］
Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ Ｅｄ．（１９９０，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ）

.
Rigby PWJ, ら（1977）. [J] Mol. Biol. 113: [237−251.]
Romano C（1965）. Lancet [I658−659.]
Romano C, ら（1963）. Clin. Pediatr. 45: 656−683.
Rook MB, ら（1999）. [CARDIOVASC.] Res. 44: 507−517.
Rosenfeld MA, ら（1992）. Cell 68: 143−155.
Ruano GおよびKidd KK（1989）. Nucl. Acids Res. 17: 8392.
Russell MW, ら（1995）. Am. [J HUM. GENET.] 57: 503−507.
Russell DおよびHirata R（1998）. Nature Genetics 18: [323−328.]
Sambrook J, ら（1989）. Molecular Cloning: A Laboratory [MANUAL, 2ND] Ed.（Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, [NY）.]
Sanguinetti MC, ら（1996）. Nature 384: 80−83.
Scharf SJ, ら [（1986）.] Science 233: 1076−1078.
Schneider G, ら [（1998）.] Nature Genetics [18]: [180−183.]
Schott J, ら（1995）. Am. J. Hum. Genet. 57: 1114−1122.
Schultze−Bahr E, ら（1997）. Nat. Genet. 17: [267−268.]
Schwartz PJ, ら（1975）. Am. [HEART J.] 109: 378−390.
Schwartz P.T, ら（1994）. "The long QT syndrome." In Cardiac Electrophysiology: from cell to bedside. D. P. Zipes and J. Jalife eds.（W. B. Sanders Company）pp. [788−811.]
Scopes R（1982）. Protein Purification: Principles and Practice,（Springer−Verlag, [NY)] Sheffield VC, ら（1989）. Proc. Natl. Acad. Sci. USA [86]: 232−236.
Sheffield VC, ら（1991）. Am. J Hum. Genet. 49: 699−706.
Shenk TE, ら（1975）. Proc. [NATL. ACAD. SCI. USA] 72: 989−993.
ShimadaT, ら（1991）. J. Clin. Invest. 88: 1043−1047.
Shinkai Y, ら（1992）. Cell 68: 855.
Shoemaker DD, ら（1996）. Nature Genetics 14: 450−456.
Snouwaert JN, ら（1992）. Science 257: 1083.
Sorge J, ら（1984）. Mol. Cell. Biol. [4]: 17

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

ＯＬ．］ ３１： ３４９－３７０．
Ｗｈｉｔｅ ＭＢ，ら（１９９２）．Ｇｅｎｏｍｉｃｓ １２： ３０１－３０６．
Ｗｈｉｔｅ ＲおよびＬａｌｏｕｅｌ ＪＭ［（１９８８）．］ Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．［２２］：２５９－２７９．
Ｗｉｌｋｎｓｏｎ ＧＷおよび［ＡＫＲＩＧＧ］Ａ（１９９２）．［ＮＵＣＬＥＩＣＡＣＩＤＳ ＲＥＳ．２０］：２２３３－２２３９．
Ｗｉｌｌｉｃｈ ＳＮ，ら［（１９８７）．］ Ａｍ．Ｊ．Ｃａｒｄｉｏ．６０：８０１－８０６．
［ＷＯＬＦＦＪＡ，］ら（１９９０）．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４７：１４６５－１４６８．
Ｗｏｌｆｆ ＪＡ，ら（１９９１）．ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １１：４７４－４８５．
Ｗｕ ＤＹおよびＷａｌｌａｃｅ ＲＢ（１９８９）．Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ４：５６０－５６９．
Ｗｕ ＣＨ，ら（１９８９）．［Ｊ ＢＩＯＬ ＣＨＥＭ．］ ２６４：１６９８５－１６９８７．
Ｗｕ ＧＹ，ら（１９９１）．［Ｊ．］ Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６６：［１４３３８－１４３４２．］
Ｚｅｎｋｅ Ｍ，ら（１９９０）．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：３６５５－３６５９．
Ｚｉｐｅｓ ＤＰ（１９８７）．Ａｍ．［Ｊ］ Ｃａｒｄｉｏ．５９：［２６Ｅ－３１Ｅ．］
特許および特許出願：
欧州特許出願公開番号０３３２４３５
ＥＰＯ公開番号２２５，８０７
Ｈｉｔｚｅｍａｎ ら，ＥＰ ７３，６７５Ａ
ＥＰ ４２５，７３１Ａ
ＷＯ ８４／０３５６４
ＷＯ ９０／０７９３６
ＷＯ ９２／１９１９５
ＷＯ ９３／０７２８２
ＷＯ ９４／２５５０３
ＷＯ ９５／０１２０３
ＷＯ ９５／０５４５２
ＷＯ ９６／０２２８６
ＷＯ ９６／０２６４６
ＷＯ ９６／１１６９８
ＷＯ ９６／４０８７１
ＷＯ ９６／４０９５９
ＷＯ ９７／０２０４８
ＷＯ ９７／１２６３５
米国特許第３，８１７，８３７
米国特許第３，８５０，７５２
米国特許第３，９３９，３５０
米国特許第３，９９６，３４５
米国特許第４，２７５，１４９
米国特許第４，２７７，４３７
米国特許第４，３６６，２４１
米国特許第４，３７６，１１０
米国特許第４，４８６，５３０

米国特許第４，５５４，１０１
米国特許第４，６８３，１９５
米国特許第４，６８３，２０２
米国特許第４，８１６，５６７
米国特許第４，８６８，１０５
米国特許第５，２５２，４７９
米国特許第５，２７０，１８４
米国特許第５，４０９，８１８
米国特許第５，４３６，１４６
米国特許第５，４５５，１６６
米国特許第５，５５０，０５０
米国特許第５，６９１，１９８
米国特許第５，７３５，５００
米国特許第５，７４７，４６９
米国特許第５，８４６，７１０
米国特許第５，８５６，０９２
米国特許第５，８８８，８１９
米国特許第６，００４，７４４

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/08381 A2

(51) International Patent Classification[7]: C12G

(21) International Application Number: PCT/US01/22639

(22) International Filing Date: 19 July 2001 (19.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/219,738 20 July 2000 (20.07.2000) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION** [US/US]; 615 Arapeen Drive, Suite 110, Salt Lake City, UT 84108 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **KEATING, Mark, T.** [US/US]; 1 Mason Street, Brookline, MA 02446 (US). **SPLAWSKI, Igor** [PL/US]; 36 Queensberry Street, Apt. 7, Boston, MA 02215 (US).

(74) Agents: **SAXE, Stephen, A.** et al.; Rothwell, Figg, Ernst & Manbeck, P.C., 555 13th Street, N.W., Suite 701-E, Washington, DC 20004 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*
— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

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

WO 02/08381 A2

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

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

TITLE OF THE INVENTION

COMMON POLYMORPHISM IN SCN5A IMPLICATED IN DRUG-INDUCED CARDIAC ARRHYTHMIA

BACKGROUND OF THE INVENTION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMMARY OF THE INVENTION

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

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

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

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

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Definitions

The present invention employs the following definitions.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

functionally equivalent to SCN5A as shown by SEQ ID NO:2 or 4. The invention also includes nucleic acid molecules that are the complements of the sequences described herein.

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

The present invention provides recombinant nucleic acids comprising all or part of the *SCN5A* region. The recombinant construct may be capable of replicating autonomously in a host cell. Alternatively, the recombinant construct may become integrated into the chromosomal DNA of the host cell. Such a recombinant polynucleotide comprises a polynucleotide of genomic, cDNA, semi-synthetic, or synthetic origin which, by virtue of its origin or manipulation, 1) is not associated with all or a portion of a polynucleotide with which it is associated in nature; 2) is linked to a polynucleotide other than that to which it is linked in nature; or 3) does not occur in nature. Where nucleic acid according to the invention includes RNA, reference to the sequence shown should be construed as reference to the RNA equivalent, with U substituted for T.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Program - blastn

Matrix - 0 BLOSUM62

Reward for a match - 0 or 1 (1)

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

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

Extension gap penalty - 0 or 1 (1)

Gap x_dropoff - 0 or 50 (50)

Expect - 10

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

5'-ACCGTAGCTACGTACGTATATAGAAAGGGCGCGATCGTCGTCGCGTATGACGAC TTAGCATGC-3' (SEQ ID NO:5)

5'-ACCGGTAGCTACGTACGTTATTTAGAAAGGGGTGTGTGTGTGTGTGTAAACCGGG GTTTTCGGGATCGTCCGTCGCGTATGACGACTTAGCCATGCACGGTATATCGTAT TAGGACTAGCGATTGACTAG-3' (SEQ ID NO:6)

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

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

TABLE 1

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

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

Typically, selective hybridization will occur when there is at least about 55% homology over a stretch of at least about 14 nucleotides, preferably at least about 65%, more preferably at least about 75%, and most preferably at least about 90%. See, Kanehisa, 1984. The length of homology comparison, as described, may be over longer stretches, and in certain embodiments will often be over a stretch of at least about nine nucleotides, usually at least about 20 nucleotides, more usually at least about 24 nucleotides, typically at least about 28 nucleotides, more typically at least about 32 nucleotides, and preferably at least about 36 or more nucleotides.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Methods of Use: Drug Screening

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Methods of Use: Nucleic Acid Diagnosis and Diagnostic Kits

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Methods of Use: Peptide Diagnosis and Diagnostic Kits

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

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

Methods of Use: Rational Drug Design

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

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

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

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

Methods of Use: Gene Therapy

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Methods of Use: Peptide Therapy

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

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

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

Methods of Use: Transformed Hosts

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pharmaceutical Compositions and Routes of Administration

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

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

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

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

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

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

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

EXAMPLES

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

EXAMPLE 1

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

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

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

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

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

EXAMPLE 2

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

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

A. *In Vitro* Assay

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

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

B. *In Vivo* Assay

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

EXAMPLE 3

Assays to Determine Whether a Drug Can Induce

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

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

A. *In Vitro* Assay

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

B. *In Vivo* Assay

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

C. *In Vivo* Assay

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

EXAMPLE 4

Generation of Polyclonal Antibody against SCN5A

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

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

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

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

EXAMPLE 5

Generation of Monoclonal Antibodies Specific for SCN5A

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

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

Spleens are removed from immune mice and a single cell suspension is prepared (see Harlow and Lane, 1988). Cell fusions are performed essentially as described by Kohler and Milstein (1975). Briefly, P3.65.3 myeloma cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) are fused with immune spleen cells using polyethylene glycol as described by Harlow and Lane (1988). Cells are plated at a density of $2x10^5$ cells/well in 96 well tissue culture plates. Individual wells are examined for growth and the supernatants of wells with growth are tested for the presence of SCN5A specific antibodies by ELISA or RIA using wild type or mutant SCN5A target protein. Cells in positive wells are expanded and subcloned to establish and confirm monoclonality.

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

EXAMPLE 6

Sandwich Assay for SCN5A

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

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

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

EXAMPLE 7

Assay to Screen Drugs Affecting the SCN5A Na^+ Channel

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

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

LIST OF REFERENCES

Altschul SF, et al. (1997). *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.

Anand, R (1992). Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press).

Anderson WF, et al. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5399-5403.

Antzelevitch C and Sicouri S (1994). *J. Am. Col. Card.* 23:259-277.

Antzelevitch C, et al. (1999). *J. Electrocardiol.* 32 (Suppl. 1):158-165.

Attali B, et al. (1993). *Nature* 365:850-852.

Attwell D, et al. (1979). *Pflugers Arch.* 379:137-142.

Ausubel FM, et al. (1992). Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, New York, NY).

Bandyopadhyay PK and Temin HM (1984). *Mol. Cell. Biol.* 4:749-754.

Bartel PL, et al. (1993). "Using the 2-hybrid system to detect protein-protein interactions." In Cellular Interactions in Development: A Practical Approach, Oxford University Press, pp. 153-179.

Bazzett H (1920). *Heart* 7:353-370.

Beaucage SL and Caruthers MH (1981). *Tetra. Letts.* 22:1859-1862.

Berglund P, et al. (1993). *Biotechnology* 11:916-920.

Berkner KL, et al. (1988). *BioTechniques* 6:616-629.

Berkner KL (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:39-66.

Borman S (1996). *Chemical & Engineering News*, December 9 issue, pp. 42-43.

Breakefield XO and Geller AI (1987). *Mol. Neurobiol.* 1:337-371.

Brinster RL, et al. (1981). *Cell* 27:223-231.

Bruggemann A, et al. (1993). *Nature* 365:445-448.

Buchschacher GL and Panganiban AT (1992). *J. Virol.* 66:2731-2739.

Busch AE, et al. (1992). *Science* 255:1705-1707.

Capecchi MR (1989). *Science* 244:1288.

Cardiac Arrhythmia Suppression Trial II Investigators (1992). *N. Engl. J. Med.* 327:227-233.

Cariello NF (1988). *Am. J. Human Genetics* 42:726-734.

Chee M, et al. (1996). *Science* 274:610-614.

Chevray PM and Nathans DN (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5789-5793.

Compton J (1991). *Nature* 350:91-92.

Conner BJ, et al. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:278-282.

Costantini F and Lacy E (1981). *Nature* 294:92-94.

Cotten M, et al. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4033-4037.

Cotton RG, et al. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397-4401.

Couderc JP, et al. (1999). *Pacing Clin. Electrophysiol.* 22:1581-1592.

Culver KW, et al. (1992). *Science* 256:1550-1552.

Culver K (1996). Gene Therapy: A Primer for Physicians, 2nd Ed., Mary Ann Liebert.

Curiel DT, et al. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8850-8854.

Curiel DT, et al. (1992). *Hum. Gene Ther.* 3:147-154.

Curran ME, et al. (1995). *Cell* 80:795-804.

DeRisi J, et al. (1996). *Nat. Genet.* 14:457-460.

Deschenes I, et al. (2000). *Cardiovasc. Res.* 46:55-65.

Deutscher M (1990). *Meth. Enzymology* 182:83-89 (Academic Press, San Diego, Cal.).

Donehower LA, et al. (1992). *Nature* 356:215.

Duggal P et al. (1998). *Circulation* 97:142-146.

Editorial (1996). *Nature Genetics* 14:367-370.

Elghanian R, et al. (1997). *Science* 277:1078-1081.

Enhancers and Eukaryotic Gene Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1983).

Erickson J, et al. (1990). *Science* 249:527-533.

Fahy E, et al. (1991). *PCR Methods Appl.* 1:25-33.

Felgner PL, et al. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417.

Fields S and Song O-K (1989). *Nature* 340:245-246.

Fiers W, et al. (1978). *Nature* 273:113-120.

Fink DJ, et al. (1992). *Hum. Gene Ther.* 3:11-19.

Fink DJ, et al. (1996). *Ann. Rev. Neurosci.* 19:265-287.

Finkelstein J, et al. (1990). *Genomics* 7:167-172.

Fodor SPA (1997). *Science* 277:393-395.

Freese A, et al. (1990). *Biochem. Pharmacol.* 40:2189-2199.

Friedman T (1991). In Therapy for Genetic Diseases, T. Friedman, ed., Oxford University Press, pp. 105-121.

Gellens M, et al. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:554-558.

George AL, et al. (1995). *Cytogenet. Cell. Genet.* 68:67-70.

Glover D (1985). DNA Cloning, I and II (Oxford Press).

Goding (1986). Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed. (Academic Press, N.Y.).

Godowski PJ, et al. (1988). *Science* 241:812-816.

Goldstein SAN and Miller C (1991). *Neuron* 7:403-408.

Gordon JW, et al. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7380-7384.

Gorziglia M and Kapikian AZ (1992). *J. Virol.* 66:4407-4412.

Graham FL and van der Eb AJ (1973). *Virology* 52:456-467.

Grompe M (1993). *Nature Genetics* 5:111-117.

Grompe M, et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5855-5892.

Guthrie G and Fink GR (1991). Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press).

Hacia JG, et al. (1996). *Nature Genetics* 14:441-447.

Harlow E and Lane D (1988). Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Hasty PK, et al. (1991). *Nature* 350:243.

Hausdorff SF, et al. (1991). *Biochem.* 30:3341-3346.

Helseth E, et al. (1990). *J. Virol.* 64:2416-2420.

Hodgson J (1991). *Bio/Technology* 9:19-21.

Huse WD, et al. (1989). *Science* 246:1275-1281.

Innis MA, et al. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, San Diego, CA).

Jablonski E, et al. (1986). *Nucl. Acids Res.* 14:6115-6128.

Jakoby WB and Pastan IH (eds.) (1979). Cell Culture. *Methods in Enzymology* Vol. 58 (Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich (NY)).

January CT and Riddle JM (1989). *Circ. Res.* 64:977-990.

Jervell A and Lange-Nielsen F (1957). *Am. Heart J.* 54:59-68.

Jiang C, et al. (1994). *Nat. Genet.* 8:141-147.

Johnson PA, et al. (1992). *J. Virol.* 66:2952-2965.

Johnson, et al. (1993). "Peptide Turn Mimetics" in Biotechnology and Pharmacy, Pezzuto et al., eds., Chapman and Hall, New York.

Kambouris NG, et al. (2000). *J. Clin. Invest.* 105:1133-1140.

Kaneda Y, et al. (1989). *J. Biol. Chem.* 264:12126-12129.

Kanehisa M (1984). *Nucl. Acids Res.* 12:203-213.

Kannel WB, et al. (1987). *Am. Heart J.* 113:799-804.

Keating MT, et al. (1991a). *Science* 252:704-706.

Keating MT, et al. (1991b). *Am. J. Hum. Genet.* 49:1335-1339.

Kinszler KW, et al. (1991). *Science* 251:1366-1370.

Kohler G and Milstein C (1975). *Nature* 256:495-497.

Kraemer FB, et al. (1993). *J. Lipid Res.* 34:663-672.

Kubo T, et al. (1988). *FEBS Lett.* 241:119.

Kyte J and Doolittle RF (1982). *J. Mol. Biol.* 157:105-132.

Landegren U, et al. (1988). *Science* 242:229-237.

Lee JE, et al. (1995). *Science* 268:836-844.

Lesage F, et al. (1993). *Receptors and Channels* 1:143-152.

Lim CS, et al. (1991). *Circulation* 83:2007-2011.

Lipshutz RJ, et al. (1995). *BioTechniques* 19:442-447.

Lockhart DJ, et al. (1996). *Nature Biotechnology* 14:1675-1680.

Madzak C, et al. (1992). *J. Gen. Virol.* 73:1533-1536.

Maniatis T, et al. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Mann R and Baltimore D (1985). *J. Virol.* 54:401-407.

Margolskee RF (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:67-95.

Martin R, et al. (1990). *BioTechniques* 9:762-768.

Matteucci MD and Caruthers MH (1981). *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185.

Matthews JA and Kricka LJ (1988). *Anal. Biochem.* 169:1.

Merrifield B (1963). *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2156.

Metzger D, et al. (1988). *Nature* 334:31-36.

Mifflin TE (1989). *Clinical Chem.* 35:1819-1825.

Miller AD (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:1-24.

Miller AD, et al. (1985). *Mol. Cell. Biol.* 5:431-437.

Miller AD, et al. (1988). *J. Virol.* 62:4337-4345.

Modrich P (1991). *Ann. Rev. Genet.* 25:229-253.

Mombaerts P, et al. (1992). *Cell* 68:869.

Moss AJ and McDonald J (1971). *N. Engl. J. Med.* 285:903-904.

Moss AJ, et al. (1991). *Circulation* 84:1136-1144.

Moss B (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:25-38.

Moss B (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11341-11348.

Muzyczka N (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:97-129.

Nabel EG, et al. (1990). *Science* 249:1285-1288.

Nabel (1992). *Hum. Gene Ther.* 3:399-410.

Naldini L, et al. (1996). *Science* 272:263-267.

Newton CR, et al. (1989). *Nucl. Acids Res.* 17:2503-2516.

Neyroud N, et al. (1997). *Nat. Genet.* 15:186-189.

Nguyen Q, et al. (1992). *BioTechniques* 13:116-123.

Novack DF, et al. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:586-590.

Ohi S, et al. (1990). *Gene* 89:279-282.

Orita M, et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766-2770.

Page KA, et al. (1990). *J. Virol.* 64:5270-5276.

Pellicer A, et al. (1980). *Science* 209:1414-1422.

Petropoulos CJ, et al. (1992). *J. Virol.* 66:3391-3397.

Philpott KL, et al. (1992). *Science* 256:1448.

Quantin B, et al. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2581-2584.

Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA).

Rigby PWJ, et al. (1977). *J. Mol. Biol.* 113:237-251.

Romano C (1965). Lancet 1658-659.

Romano C, et al. (1963). *Clin. Pediatr.* 45:656-683.

Rook MB, et al. (1999). *Cardiovasc. Res.* 44:507-517.

Rosenfeld MA, et al. (1992). *Cell* 68:143-155.

Ruano G and Kidd KK (1989). *Nucl. Acids Res.* 17:8392.

Russell MW, et al. (1995). *Am. J. Hum. Genet.* 57:503-507.

Russell D and Hirata R (1998). *Nature Genetics* 18:323-328.

Sambrook J, et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Sanguinetti MC, et al. (1996). *Nature* 384:80-83.

Scharf SJ, et al. (1986). *Science* 233:1076-1078.

Schneider G, et al. (1998). *Nature Genetics* 18:180-183.

Schott J, et al. (1995). *Am. J. Hum. Genet.* 57:1114-1122.

Schultze-Bahr E, et al. (1997). *Nat. Genet.* 17:267-268.

Schwartz PJ, et al. (1975). *Am. Heart J.* 109:378-390.

Schwartz PJ, et al. (1994). "The long QT syndrome." In Cardiac Electrophysiology: from cell to bedside. D. P. Zipes and J. Jalife eds. (W.B. Sanders Company) pp.788-811.

Scopes R. (1982). Protein Purification: Principles and Practice, (Springer-Verlag, NY).

Sheffield VC, et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:232-236.

Sheffield VC, et al. (1991). *Am. J. Hum. Genet.* 49:699-706.

Shenk TE, et al. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:989-993.

Shimada T, et al. (1991). *J. Clin. Invest.* 88:1043-1047.

Shinkai Y, et al. (1992). *Cell* 68:855.

Shoemaker DD, et al. (1996). *Nature Genetics* 14:450-456.

Snouwaert JN, et al. (1992). *Science* 257:1083.

Sorge J, et al. (1984). *Mol. Cell. Biol.* 4:1730-1737.

Spargo CA, et al. (1996). *Mol. Cell. Probes* 10:247-256.

Splawski I, et al. (1997a). *N. Engl. J. Med.* 336:1562-1567.

Splawski I, et al. (1997b). *Nat. Genet.* 17:338-340.

Stewart MJ, et al. (1992). *Hum. Gene Ther.* 3:267-275.

Stratford-Perricaudet LD, et al. (1990). *Hum. Gene Ther.* 1:241-256.

Surawicz B (1989). *J. Am. Coll. Cardiol.* 14:172-184.

Takumi T, et al. (1988). *Science* 242:1042-1045.

Takumi T, et al. (1991). *J. Biol. Chem.* 266:22192-22198.

Tyson J, et al. (1997). *Hum. Mol. Genet.* 6:2179-2185.

Valancius V and Smithies O (1991). *Mol. Cell Biol.* 11:1402.

Veldkamp MW, et al. (2000). *Circ. Res.* 12:E91-E97.

Vetter DE, et al. (1996). *Neuron* 17:1251-1264.

Vincent GM, et al. (1992). *N. Engl. J. Med.* 327:846-852.

Wagner E, et al. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4255-4259.

Wagner E, et al. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3410-3414.

Walker GT, et al., (1992). *Nucl. Acids Res.* 20:1691-1696.

Wang CY and Huang L (1989). *Biochemistry* 28:9508-9514.

Wang DW, et al. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13200-13205.

Wang KW and Goldstein SA (1995). *Neuron* 14:1303-1309.

Wang KW, et al. (1996). *Neuron* 16:571-577.

Wang Q, et al. (1995). *Cell* 80:805-811.

Wang Q, et al. (1996). *Nat. Genet.* 12:17-23.

Ward OC (1964). *J. Ir. Med. Assoc.* 54:103-106.

Warmke JE and Ganetzky B (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:3438-3442.

Wartell RM, et al. (1990). *Nucl. Acids Res.* 18:2699-2705.

Wells JA (1991). *Methods Enzymol.* 202:390-411.

Wetmur JG and Davidson N (1968). *J. Mol. Biol.* 31:349-370.

White MB, et al. (1992). *Genomics* 12:301-306.

White R and Lalouel JM (1988). *Annu. Rev. Genet.* 22:259-279.

Wilkinson GW and Akrigg A (1992). *Nucleic Acids Res.* 20:2233-2239.

Willich SN, et al. (1987). *Am. J. Cardiol.* 60:801-806.

Wolff JA, et al. (1990). *Science* 247:1465-1468.

Wolff JA, et al. (1991). *BioTechniques* 11:474-485.

Wu DY and Wallace RB (1989). *Genomics* 4:560-569.

Wu CH, et al. (1989). *J. Biol. Chem.* 264:16985-16987.

Wu GY, et al. (1991). *J. Biol. Chem.* 266:14338-14342.

Zenke M, et al. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3655-3659.

Zipes DP (1987). *Am. J. Cardiol.* 59:26E-31E.

Patents and Patent Applications:

European Patent Application Publication No. 0332435.

EPO Publication No. 225,807.

Hitzeman et al., EP 73,675A.

EP 425,731A.

WO 84/03564.

WO 90/07936.

WO 92/19195.

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

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

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated DNA comprising a nucleic acid encoding the polypeptide of SEQ ID NO:4.

2. A nucleic acid probe which hybridizes specifically to the DNA of claim 1 under stringent hybridization conditions wherein said stringent hybridization conditions prevent said nucleic acid probe from hybridizing to DNA of SEQ ID NO:1.

3. A method for diagnosing a polymorphism which causes predisposition to drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation comprising hybridizing a probe of claim 2 to a patient's sample of DNA or RNA under stringent conditions which allow hybridization of said probe to nucleic acid comprising said polymorphism but prevent hybridization of said probe to a nucleic acid of SEQ ID NO:1 wherein the presence of a hybridization signal indicates the presence of said polymorphism.

4. The method according to claim 3 wherein the patient's DNA or RNA has been amplified and said amplified DNA or RNA is hybridized.

5. A method according to claim 3 wherein hybridization is performed *in situ*.

6. A method for diagnosing the presence of a polymorphism in human *SCN5A* which causes predisposition to drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation wherein said method is performed by means which identify the presence of said polymorphism, wherein said polymorphism is one which results in *SCN5A* encoding the polypeptide of SEQ ID NO:4.

7. The method of claim 6 wherein said means comprises:
a) using a single-stranded conformation polymorphism technique to assay for said polymorphism;
b) sequencing human *SCN5A*;
c) performing an RNAse assay;

d) performing an allele specific hybridization;

e) performing a single base extension assay;

f) performing an allele specific polymerase chain reaction;

g) amplifying all or part of the *SCN5A* gene from a patient's sample to produce an amplified sequence and sequencing the amplified sequence;

h) molecularly cloning all or part of the SCN5A gene from a patient's sample to produce a cloned sequence and sequencing the cloned sequence;

i) amplification of SCN5A gene sequences in a patient's sample and hybridization of the amplified sequences to nucleic acid probes which comprise wild-type SCN5A gene sequences;

j) amplification of SCN5A gene sequences in said tissue and hybridization of the amplified sequences to nucleic acid probes which comprise mutant SCN5A gene sequences;

k) determining *in situ* hybridization of the SCN5A gene from a patient's sample with one or more nucleic acid probes which comprise the SCN5A gene sequence or a mutant SCN5A gene sequence;

l) immunoblotting; and

m) immunocytochemistry.

8. An isolated polypeptide of SEQ ID NO:4.

9. An antibody which binds to the polypeptide of claim 8 but not to wild-type SCN5A polypeptide.

10. A method for diagnosing predisposition to drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation said method consisting of an assay for the presence of mutant SCN5A polypeptide in a patient by reacting a patient's sample with an antibody of claim 9 wherein the presence of a positive reaction is indicative of said predisposition.

11. The method of claim 10 wherein said antibody is a monoclonal antibody.

12. The method of claim 10 wherein said assay comprises immunoblotting.

13. The method of claim 10 wherein said assay comprises an immunocytochemical technique.

14. A method for diagnosing predisposition to drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation in a person wherein said method comprises sequencing an SCN5A polypeptide from said person or sequencing SCN5A polypeptide synthesized from nucleic acid derived from said person wherein the presence a tyrosine at amino acid residue 1103 is indicative of said predisposition.

15. A cell transfected with the DNA of claim 1.

16. A vector comprising the isolated DNA of claim 1.

17. A cell transfected with the vector of claim 16.

18. A nonhuman, transgenic animal comprising the DNA of claim 1.

19. A method to screen for drugs which are useful in treating a person with a mutation in *SCN5A* wherein said mutation results in *SCN5A* encoding the polypeptide of SEQ ID NO:4, wherein said method comprises:
(a) placing a first set of cells expressing SCN5A with said mutation into a bathing solution;
(b) inducing a first induced Na^+ current in the cells of step (a);
(c) measuring said first induced Na^+ current;
(d) placing a second set of cells expressing wild-type SCN5A into a bathing solution;
(e) inducing a second induced Na^+ current in the cells of step (d);
(f) measuring said second induced Na^+ current;
(g) adding a drug to the bathing solution of step (a);
(h) inducing a third induced Na^+ current in the cells of step (g);
(i) measuring said third induced Na^+ current; and
(j) determining whether the third induced Na^+ current is more similar to the second induced Na^+ current than is the first induced Na^+ current, wherein drugs resulting in a third induced

Na^+ current which is closer to the second induced Na^+ current than is the first induced Na^+ current are useful in treating said persons.

20. The method of claim 19 wherein said first set of cells, said second set of cells or both sets of cells are obtained from a transgenic animal.

21. The method of claim 19 wherein said first set of cells, said second set of cells or both sets of cells are transfected with human *SCN5A* RNA.

22. A method to screen for drugs which are useful in treating or preventing drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation, said method comprising:
(a) placing cells expressing wild-type *SCN5A* into a bathing solution to measure current;
(b) inducing a first induced Na^+ current in the cells of step (a)
(c) measuring said first induced Na^+ current;
(d) placing cells expressing mutant *SCN5A*, wherein said mutant *SCN5A* encodes a polypeptide of SEQ ID NO:4, into a bathing solution to measure current;
(e) inducing a second induced Na^+ current in the cells of step (d);
(f) measuring said second induced Na^+ current;
(g) adding a drug to the bathing solution of step (d);
(h) inducing a third induced Na^+ current in the cells of step (g);
(i) measuring said third induced Na^+ current; and
(j) determining whether the drug resulted in said third induced Na^+ current being more similar to or less similar to said first induced Na^+ current as compared to said second induced Na^+ current,

wherein a drug which results in said third induced Na^+ current being more similar to said first induced Na^+ current than is said second induced Na^+ current is useful in treating or preventing drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation.

23. The method of claim 22 wherein: i) said cells of step (a), ii) said cells of step (d) or iii) said cells of steps (a) and (d) are transfected with RNA.

24. A method to screen for drugs which are useful in treating or preventing drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation, said method comprising:

(a) preparing a transgenic animal transfected with wild-type *SCN5A*;

(b) inducing a first induced Na^+ current in transgenic cells of said transgenic animal;

(c) measuring said first induced Na^+ current;

(d) preparing a transgenic animal transfected with mutant *SCN5A*, wherein said mutant *SCN5A* encodes a polypeptide of SEQ ID NO:4;

(e) inducing a second induced Na^+ current in transgenic cells of said transgenic animal of step (d);

(f) measuring said second induced Na^+ current;

(g) administering a drug to the transgenic animal of step (d);

(h) inducing a third induced Na^+ current in transgenic cells of said transgenic animal of step (g);

(i) measuring said third induced Na^+ current; and

(j) determining whether said third induced Na^+ current is more similar to or less similar to said first induced Na^+ current as compared to said second induced Na^+,

wherein a drug which results in said third induced Na^+ current being more similar to said first induced Na^+ current than is said second induced Na^+ current is useful in treating or preventing drug-induced *torsade de pointes* or ventricular fibrillation.

25. A method to determine whether a drug has a risk of inducing *torsade de pointes* or ventricular fibrillation in a patient wherein said patient's genome comprises a gene encoding a polypeptide of SEQ ID NO:4, comprising:

a) placing cells expressing mutant *SCN5A*, wherein said mutant *SCN5A* encodes a polypeptide of SEQ ID NO:4, into a bathing solution to measure current;

b) inducing a first induced Na^+ current in the cells of step (a);

c) measuring said first induced Na^+ current;

d) adding said drug to the bathing solution of step (c);

e) inducing a second induced Na^+ current in the cells of step (d);

f) measuring said second induced Na^+ current; and

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

26. The method of claim 25 wherein said cells are obtained from a transgenic animal.

27. The method of claim 25 wherein said cells are transfected with human *SCN5A* RNA encoding a polypeptide of SEQ ID NO:4.

28. A method to screen for drugs which present a risk of inducing *torsade de pointes* or ventricular fibrillation, said method comprising:
a) preparing a transgenic animal transfected with mutant *SCN5A*, wherein said mutant *SCN5A* encodes a polypeptide of SEQ ID NO:4;
b) inducing a first induced Na^+ current in transgenic cells of said transgenic animal of step (a);
c) measuring said first induced Na^+ current;
d) administering a drug to said transgenic animal;
e) inducing a second induced Na^+ current in transgenic cells of said transgenic animal of step (d);
f) measuring said second induced Na^+ current;
g) determining whether said second induced Na^+ current is different from said first induced Na^+ current;
wherein a drug which results in a different current presents a risk of inducing *torsade de pointes* or ventricular fibrillation in a person comprising a gene encoding a polypeptide of SEQ ID NO:4.

29. A method to screen for drugs which present a risk of inducing *torsade de pointes* or ventricular fibrillation, said method comprising:
(a) preparing a transgenic animal transfected with mutant *SCN5A*, wherein said mutant *SCN5A* encodes a polypeptide of SEQ ID NO:4;
(b) administering a drug to the transgenic animal of step (a); and

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

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

31. The method of claim 30 wherein said host cell is transfected with RNA.

SEQUENCE LISTING

<110> University of Utah Research Foundation

Keating, Mark T.

Splawski, Igor

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

<130> 2323-154.PCT

<160> 6
<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
<211> 8491
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

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

<400> 1
```
gccgctgagc ctgcgcccag tgccccgagc cccgcgccga gccgagtccg cgccaagcag      60

cagccgccca ccccggggcc cggccggggg accagcagct tccccacagg caacgtgagg     120

agagcctgtg cccagaagca ggatgagaag atg gca aac ttc cta tta cct cgg       174
                                Met Ala Asn Phe Leu Leu Pro Arg
                                1               5

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

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

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

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

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

```
acc caa aag act ttc atc gta ctg aat aaa ggc aag acc atc ttc cgg      462
Thr Gln Lys Thr Phe Ile Val Leu Asn Lys Gly Lys Thr Ile Phe Arg
    90                  95                  100

ttc agt gcc acc aac gcc ttg tat gtc ctc agt ccc ttc cac cca gtt      510
Phe Ser Ala Thr Asn Ala Leu Tyr Val Leu Ser Pro Phe His Pro Val
105                 110                 115                 120

cgg aga gcg gct gtg aag att ctg gtt cac tcg ctc ttc aac atg ctc      558
Arg Arg Ala Ala Val Lys Ile Leu Val His Ser Leu Phe Asn Met Leu
                125                 130                 135

atc atg tgc acc atc ctc acc aac tgc gtg ttc atg gcc cag cac gac      606
Ile Met Cys Thr Ile Leu Thr Asn Cys Val Phe Met Ala Gln His Asp
            140                 145                 150

cct cca ccc tgg acc aag tat gtc gag tac acc ttc acc gcc att tac      654
Pro Pro Pro Trp Thr Lys Tyr Val Glu Tyr Thr Phe Thr Ala Ile Tyr
        155                 160                 165

acc ttt gag tct ctg gtc aag att ctg gct cga gct ttc tgc ctg cac      702
Thr Phe Glu Ser Leu Val Lys Ile Leu Ala Arg Ala Phe Cys Leu His
    170                 175                 180

gcg ttc act ttc ctt cgg gac cca tgg aac tgg ctg gac ttt agt gtg      750
Ala Phe Thr Phe Leu Arg Asp Pro Trp Asn Trp Leu Asp Phe Ser Val
185                 190                 195                 200

att atc atg gca tac aca act gaa ttt gtg gac ctg ggc aat gtc tca      798
Ile Ile Met Ala Tyr Thr Thr Glu Phe Val Asp Leu Gly Asn Val Ser
                205                 210                 215

gcc tta cgc acc ttc cga gtc ctc cgg gcc ctg aaa act ata tca gtc      846
Ala Leu Arg Thr Phe Arg Val Leu Arg Ala Leu Lys Thr Ile Ser Val
            220                 225                 230

att tca ggg ctg aag acc atc gtg ggg gcc ctg atc cag tct gtg aag      894
Ile Ser Gly Leu Lys Thr Ile Val Gly Ala Leu Ile Gln Ser Val Lys
        235                 240                 245

aag ctg gct gat gtg atg gtc ctc aca gtc ttc tgc ctc agc gtc ttt      942
Lys Leu Ala Asp Val Met Val Leu Thr Val Phe Cys Leu Ser Val Phe
    250                 255                 260

gcc ctc atc ggc ctg cag ctc ttc atg ggc aac cta agg cac aag tgt      990
Ala Leu Ile Gly Leu Gln Leu Phe Met Gly Asn Leu Arg His Lys Cys
265                 270                 275                 280

gtg cgc aac ttc aca gcg ctc aac ggc acc aac ggc tcc gtg gag gcc     1038
Val Arg Asn Phe Thr Ala Leu Asn Gly Thr Asn Gly Ser Val Glu Ala
                285                 290                 295

gac ggc ttg gtc tgg gaa tcc ctg gac ctt tac ctc agt gat cca gaa     1086
Asp Gly Leu Val Trp Glu Ser Leu Asp Leu Tyr Leu Ser Asp Pro Glu
            300                 305                 310

aat tac ctg ctc aag aac ggc acc tct gat gtg tta ctg tgt ggg aac     1134
Asn Tyr Leu Leu Lys Asn Gly Thr Ser Asp Val Leu Leu Cys Gly Asn
        315                 320                 325

agc tct gac gct ggg aca tgt ccg gag ggc tac cgg tgc cta aag gca     1182
Ser Ser Asp Ala Gly Thr Cys Pro Glu Gly Tyr Arg Cys Leu Lys Ala
    330                 335                 340
```

```
ggc gag aac ccc gac cac ggc tac acc agc ttc gat tcc ttt gcc tgg     1230
Gly Glu Asn Pro Asp His Gly Tyr Thr Ser Phe Asp Ser Phe Ala Trp
345                 350                 355                 360

gcc ttt ctt gca ctc ttc cgc ctg atg acg cag gac tgc tgg gag cgc     1278
Ala Phe Leu Ala Leu Phe Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Trp Glu Arg
                365                 370                 375

ctc tat cag cag acc ctc agg tcc gca ggg aag atc tac atg atc ttc     1326
Leu Tyr Gln Gln Thr Leu Arg Ser Ala Gly Lys Ile Tyr Met Ile Phe
            380                 385                 390

ttc atg ctt gtc atc ttc ctg ggg tcc ttc tac ctg gtg aac ctg atc     1374
Phe Met Leu Val Ile Phe Leu Gly Ser Phe Tyr Leu Val Asn Leu Ile
        395                 400                 405

ctg gcc gtg gtc gca atg gcc tat gag gag caa aac caa gcc acc atc     1422
Leu Ala Val Val Ala Met Ala Tyr Glu Glu Gln Asn Gln Ala Thr Ile
    410                 415                 420

gct gag acc gag gag aag gaa aag cgc ttc cag gag gcc atg gaa atg     1470
Ala Glu Thr Glu Glu Lys Glu Lys Arg Phe Gln Glu Ala Met Glu Met
425                 430                 435                 440

ctc aag aaa gaa cac gag gcc ctc acc atc agg ggt gtg gat acc gtg     1518
Leu Lys Lys Glu His Glu Ala Leu Thr Ile Arg Gly Val Asp Thr Val
                445                 450                 455

tcc cgt agc tcc ttg gag atg tcc cct ttg gcc cca gta aac agc cat     1566
Ser Arg Ser Ser Leu Glu Met Ser Pro Leu Ala Pro Val Asn Ser His
            460                 465                 470

gag aga aga agc aag agg aga aaa cgg atg tct tca gga act gag gag     1614
Glu Arg Arg Ser Lys Arg Arg Lys Arg Met Ser Ser Gly Thr Glu Glu
        475                 480                 485

tgt ggg gag gac agg ctc ccc aag tct gac tca gaa gat ggt ccc aga     1662
Cys Gly Glu Asp Arg Leu Pro Lys Ser Asp Ser Glu Asp Gly Pro Arg
    490                 495                 500

gca atg aat cat ctc agc ctc acc cgt ggc ctc agc agg act tct atg     1710
Ala Met Asn His Leu Ser Leu Thr Arg Gly Leu Ser Arg Thr Ser Met
505                 510                 515                 520

aag cca cgt tcc agc cgc ggg agc att ttc acc ttt cgc agg cga gac     1758
Lys Pro Arg Ser Ser Arg Gly Ser Ile Phe Thr Phe Arg Arg Arg Asp
                525                 530                 535

ctg ggt tct gaa gca gat ttt gca gat gat gaa aac agc aca gcg cgg     1806
Leu Gly Ser Glu Ala Asp Phe Ala Asp Asp Glu Asn Ser Thr Ala Arg
            540                 545                 550

gag agc gag agc cac cac aca tca ctg ctg gtg ccc tgg ccc ctg cgc     1854
Glu Ser Glu Ser His His Thr Ser Leu Leu Val Pro Trp Pro Leu Arg
        555                 560                 565

cgg acc agt gcc cag gga cag ccc agt ccc gga acc tcg gct cct ggc     1902
Arg Thr Ser Ala Gln Gly Gln Pro Ser Pro Gly Thr Ser Ala Pro Gly
    570                 575                 580

cac gcc ctc cat ggc aaa aag aac agc act gtg gac tgc aat ggg gtg     1950
His Ala Leu His Gly Lys Lys Asn Ser Thr Val Asp Cys Asn Gly Val
585                 590                 595                 600
```

```
gtc tca tta ctg ggg gca ggc gac cca gag gcc aca tcc cca gga agc     1998
Val Ser Leu Leu Gly Ala Gly Asp Pro Glu Ala Thr Ser Pro Gly Ser
                605                 610                 615

cac ctc ctc cgc cct gtg atg cta gag cac ccg cca gac acg acc acg     2046
His Leu Leu Arg Pro Val Met Leu Glu His Pro Pro Asp Thr Thr Thr
            620                 625                 630

cca tcg gag gag cca ggc ggc ccc cag atg ctg acc tcc cag gct ccg     2094
Pro Ser Glu Glu Pro Gly Gly Pro Gln Met Leu Thr Ser Gln Ala Pro
        635                 640                 645

tgt gta gat ggc ttc gag gag cca gga gca cgg cag cgg gcc ctc agc     2142
Cys Val Asp Gly Phe Glu Glu Pro Gly Ala Arg Gln Arg Ala Leu Ser
    650                 655                 660

gca gtc agc gtc ctc aca agc gca ctg gaa gag tta gag gag tct cgc     2190
Ala Val Ser Val Leu Thr Ser Ala Leu Glu Glu Leu Glu Glu Ser Arg
665                 670                 675                 680

cac aag tgt cca cca tgc tgg aac cgt ctc gcc cag cgc tac ctg atc     2238
His Lys Cys Pro Pro Cys Trp Asn Arg Leu Ala Gln Arg Tyr Leu Ile
                685                 690                 695

tgg gag tgc tgc ccg ctg tgg atg tcc atc aag cag gga gtg aag ttg     2286
Trp Glu Cys Cys Pro Leu Trp Met Ser Ile Lys Gln Gly Val Lys Leu
            700                 705                 710

gtg gtc atg gac ccg ttt act gac ctc acc atc act atg tgc atc gta     2334
Val Val Met Asp Pro Phe Thr Asp Leu Thr Ile Thr Met Cys Ile Val
        715                 720                 725

ctc aac aca ctc ttc atg gcg ctg gag cac tac aac atg aca agt gaa     2382
Leu Asn Thr Leu Phe Met Ala Leu Glu His Tyr Asn Met Thr Ser Glu
    730                 735                 740

ttc gag gag atg ctg cag gtc gga aac ctg gtc ttc aca ggg att ttc     2430
Phe Glu Glu Met Leu Gln Val Gly Asn Leu Val Phe Thr Gly Ile Phe
745                 750                 755                 760

aca gca gag atg acc ttc aag atc att gcc ctc gac ccc tac tac tac     2478
Thr Ala Glu Met Thr Phe Lys Ile Ile Ala Leu Asp Pro Tyr Tyr Tyr
                765                 770                 775

ttc caa cag ggc tgg aac atc ttc gac agc atc atc gtc atc ctt agc     2526
Phe Gln Gln Gly Trp Asn Ile Phe Asp Ser Ile Ile Val Ile Leu Ser
            780                 785                 790

ctc atg gag ctg ggc ctg tcc cgc atg agc aac ttg tcg gtg ctg cgc     2574
Leu Met Glu Leu Gly Leu Ser Arg Met Ser Asn Leu Ser Val Leu Arg
        795                 800                 805

tcc ttc cgc ctg ctg cgg gtc ttc aag ctg gcc aaa tca tgg ccc acc     2622
Ser Phe Arg Leu Leu Arg Val Phe Lys Leu Ala Lys Ser Trp Pro Thr
    810                 815                 820

ctg aac aca ctc atc aag atc atc ggg aac tca gtg ggg gca ctg ggg     2670
Leu Asn Thr Leu Ile Lys Ile Ile Gly Asn Ser Val Gly Ala Leu Gly
825                 830                 835                 840

aac ctg aca ctg gtg cta gcc atc atc gtg ttc atc ttt gct gtg gtg     2718
Asn Leu Thr Leu Val Leu Ala Ile Ile Val Phe Ile Phe Ala Val Val
                845                 850                 855
```

```
ggc atg cag ctc ttt ggc aag aac tac tcg gag ctg agg gac agc gac     2766
Gly Met Gln Leu Phe Gly Lys Asn Tyr Ser Glu Leu Arg Asp Ser Asp
            860                 865                 870

tca ggc ctg ctg cct cgc tgg cac atg atg gac ttc ttt cat gcc ttc     2814
Ser Gly Leu Leu Pro Arg Trp His Met Met Asp Phe Phe His Ala Phe
        875                 880                 885

cta atc atc ttc cgc atc ctc tgt gga gag tgg atc gag acc atg tgg     2862
Leu Ile Ile Phe Arg Ile Leu Cys Gly Glu Trp Ile Glu Thr Met Trp
    890                 895                 900

gac tgc atg gag gtg tcg ggg cag tca tta tgc ctg ctg gtc ttc ttg     2910
Asp Cys Met Glu Val Ser Gly Gln Ser Leu Cys Leu Leu Val Phe Leu
905                 910                 915                 920

ctt gtt atg gtc att ggc aac ctt gtg gtc ctg aat ctc ttc ctg gcc     2958
Leu Val Met Val Ile Gly Asn Leu Val Val Leu Asn Leu Phe Leu Ala
                925                 930                 935

ttg ctg ctc agc tcc ttc agt gca gac aac ctc aca gcc cct gat gag     3006
Leu Leu Leu Ser Ser Phe Ser Ala Asp Asn Leu Thr Ala Pro Asp Glu
            940                 945                 950

gac aga gag atg aac aac ctc cag ctg gcc ctg gcc cgc atc cag agg     3054
Asp Arg Glu Met Asn Asn Leu Gln Leu Ala Leu Ala Arg Ile Gln Arg
        955                 960                 965

ggc ctg cgc ttt gtc aag cgg acc acc tgg gat ttc tgc tgt ggt ctc     3102
Gly Leu Arg Phe Val Lys Arg Thr Thr Trp Asp Phe Cys Cys Gly Leu
    970                 975                 980

ctg cgg cac cgg cct cag aag ccc gca gcc ctt gcc gcc cag ggc cag     3150
Leu Arg His Arg Pro Gln Lys Pro Ala Ala Leu Ala Ala Gln Gly Gln
985                 990                 995                 1000

ctg ccc agc tgc att  gcc acc ccc tac tcc  ccg cca ccc cca gag       3195
Leu Pro Ser Cys Ile  Ala Thr Pro Tyr Ser  Pro Pro Pro Pro Glu
                1005                1010                1015

acg gag aag gtg cct  ccc acc cgc aag gaa  aca cag ttt gag gaa       3240
Thr Glu Lys Val Pro  Pro Thr Arg Lys Glu  Thr Gln Phe Glu Glu
                1020                1025                1030

ggc gag caa cca ggc  cag ggc acc ccc ggg  gat cca gag ccc gtg       3285
Gly Glu Gln Pro Gly  Gln Gly Thr Pro Gly  Asp Pro Glu Pro Val
                1035                1040                1045

tgt gtg ccc atc gct  gtg gcc gag tca gac  aca gat gac caa gaa       3330
Cys Val Pro Ile Ala  Val Ala Glu Ser Asp  Thr Asp Asp Gln Glu
                1050                1055                1060

gag gat gag gag aac  agc ctg ggc acg gag  gag gag tcc agc aag       3375
Glu Asp Glu Glu Asn  Ser Leu Gly Thr Glu  Glu Glu Ser Ser Lys
                1065                1070                1075

cag cag gaa tcc cag  cct gtg tcc ggc tgg  ccc aga ggc cct ccg       3420
Gln Gln Glu Ser Gln  Pro Val Ser Gly Trp  Pro Arg Gly Pro Pro
                1080                1085                1090

gat tcc agg acc tgg  agc cag gtg tca gcg  act gcc tcc tct gag       3465
Asp Ser Arg Thr Trp  Ser Gln Val Ser Ala  Thr Ala Ser Ser Glu
                1095                1100                1105
```

```
gcc gag gcc agt gca  tct cag gcc gac tgg  cgg cag cag tgg aaa       3510
Ala Glu Ala Ser Ala  Ser Gln Ala Asp Trp  Arg Gln Gln Trp Lys
                1110                1115                1120

gcg gaa ccc cag gcc  cca ggg tgc ggt gag  acc cca gag gac agt       3555
Ala Glu Pro Gln Ala  Pro Gly Cys Gly Glu  Thr Pro Glu Asp Ser
                1125                1130                1135

tgc tcc gag ggc agc  aca gca gac atg acc  aac acc gct gag ctc       3600
Cys Ser Glu Gly Ser  Thr Ala Asp Met Thr  Asn Thr Ala Glu Leu
                1140                1145                1150

ctg gag cag atc cct  gac ctc ggc cag gat  gtc aag gac cca gag       3645
Leu Glu Gln Ile Pro  Asp Leu Gly Gln Asp  Val Lys Asp Pro Glu
                1155                1160                1165

gac tgc ttc act gaa  ggc tgt gtc cgg cgc  tgt ccc tgc tgt gcg       3690
Asp Cys Phe Thr Glu  Gly Cys Val Arg Arg  Cys Pro Cys Cys Ala
                1170                1175                1180

gtg gac acc aca cag  gcc cca ggg aag gtc  tgg tgg cgg ttg cgc       3735
Val Asp Thr Thr Gln  Ala Pro Gly Lys Val  Trp Trp Arg Leu Arg
                1185                1190                1195

aag acc tgc tac cac  atc gtg gag cac agc  tgg ttc gag aca ttc       3780
Lys Thr Cys Tyr His  Ile Val Glu His Ser  Trp Phe Glu Thr Phe
                1200                1205                1210

atc atc ttc atg atc  cta ctc agc agt gga  gcg ctg gcc ttc gag       3825
Ile Ile Phe Met Ile  Leu Leu Ser Ser Gly  Ala Leu Ala Phe Glu
                1215                1220                1225

gac atc tac cta gag  gag cgg aag acc atc  aag gtt ctg ctt gag       3870
Asp Ile Tyr Leu Glu  Glu Arg Lys Thr Ile  Lys Val Leu Leu Glu
                1230                1235                1240

tat gcc gac aag atg  ttc aca tat gtc ttc  gtg ctg gag atg ctg       3915
Tyr Ala Asp Lys Met  Phe Thr Tyr Val Phe  Val Leu Glu Met Leu
                1245                1250                1255

ctc aag tgg gtg gcc  tac ggc ttc aag aag  tac ttc acc aat gcc       3960
Leu Lys Trp Val Ala  Tyr Gly Phe Lys Lys  Tyr Phe Thr Asn Ala
                1260                1265                1270

tgg tgc tgg ctc gac  ttc ctc atc gta gac  gtc tct ctg gtc agc       4005
Trp Cys Trp Leu Asp  Phe Leu Ile Val Asp  Val Ser Leu Val Ser
                1275                1280                1285

ctg gtg gcc aac acc  ctg ggc ttt gcc gag  atg ggc ccc atc aag       4050
Leu Val Ala Asn Thr  Leu Gly Phe Ala Glu  Met Gly Pro Ile Lys
                1290                1295                1300

tca ctg cgg acg ctg  cgt gca ctc cgt cct  ctg aga gct ctg tca       4095
Ser Leu Arg Thr Leu  Arg Ala Leu Arg Pro  Leu Arg Ala Leu Ser
                1305                1310                1315

cga ttt gag ggc atg  agg gtg gtg gtc aat  gcc ctg gtg ggc gcc       4140
Arg Phe Glu Gly Met  Arg Val Val Val Asn  Ala Leu Val Gly Ala
                1320                1325                1330

atc ccg tcc atc atg  aac gtc ctc ctc gtc  tgc ctc atc ttc tgg       4185
Ile Pro Ser Ile Met  Asn Val Leu Leu Val  Cys Leu Ile Phe Trp
                1335                1340                1345
```

```
ctc atc ttc agc atc  atg ggc gtg aac ctc  ttt gcg ggg aag ttt       4230
Leu Ile Phe Ser Ile  Met Gly Val Asn Leu  Phe Ala Gly Lys Phe
                1350                1355                1360

ggg agg tgc atc aac  cag aca gag gga gac  ttg cct ttg aac tac       4275
Gly Arg Cys Ile Asn  Gln Thr Glu Gly Asp  Leu Pro Leu Asn Tyr
                1365                1370                1375

acc atc gtg aac aac  aag agc cag tgt gag  tcc ttg aac ttg acc       4320
Thr Ile Val Asn Asn  Lys Ser Gln Cys Glu  Ser Leu Asn Leu Thr
                1380                1385                1390

gga gaa ttg tac tgg  acc aag gtg aaa gtc  aac ttt gac aac gtg       4365
Gly Glu Leu Tyr Trp  Thr Lys Val Lys Val  Asn Phe Asp Asn Val
                1395                1400                1405

ggg gcc ggg tac ctg  gcc ctt ctg cag gtg  gca aca ttt aaa ggc       4410
Gly Ala Gly Tyr Leu  Ala Leu Leu Gln Val  Ala Thr Phe Lys Gly
                1410                1415                1420

tgg atg gac att atg  tat gca gct gtg gac  tcc agg ggg tat gaa       4455
Trp Met Asp Ile Met  Tyr Ala Ala Val Asp  Ser Arg Gly Tyr Glu
                1425                1430                1435

gag cag cct cag tgg  gaa tac aac ctc tac  atg tac atc tat ttt       4500
Glu Gln Pro Gln Trp  Glu Tyr Asn Leu Tyr  Met Tyr Ile Tyr Phe
                1440                1445                1450

gtc att ttc atc atc  ttt ggg tct ttc ttc  acc ctg aac ctc ttt       4545
Val Ile Phe Ile Ile  Phe Gly Ser Phe Phe  Thr Leu Asn Leu Phe
                1455                1460                1465

att ggt gtc atc att  gac aac ttc aac caa  cag aag aaa aag tta       4590
Ile Gly Val Ile Ile  Asp Asn Phe Asn Gln  Gln Lys Lys Lys Leu
                1470                1475                1480

ggg ggc cag gac atc  ttc atg aca gag gag  cag aag aag tac tac       4635
Gly Gly Gln Asp Ile  Phe Met Thr Glu Glu  Gln Lys Lys Tyr Tyr
                1485                1490                1495

aat gcc atg aag aag  ctg ggc tcc aag aag  ccc cag aag ccc atc       4680
Asn Ala Met Lys Lys  Leu Gly Ser Lys Lys  Pro Gln Lys Pro Ile
                1500                1505                1510

cca cgg ccc ctg aac  aag tac cag ggc ttc  ata ttc gac att gtg       4725
Pro Arg Pro Leu Asn  Lys Tyr Gln Gly Phe  Ile Phe Asp Ile Val
                1515                1520                1525

acc aag cag gcc ttt  gac gtc acc atc atg  ttt ctg atc tgc ttg       4770
Thr Lys Gln Ala Phe  Asp Val Thr Ile Met  Phe Leu Ile Cys Leu
                1530                1535                1540

aat atg gtg acc atg  atg gtg gag aca gat  gac caa agt cct gag       4815
Asn Met Val Thr Met  Met Val Glu Thr Asp  Asp Gln Ser Pro Glu
                1545                1550                1555

aaa atc aac atc ttg  gcc aag atc aac ctg  ctc ttt gtg gcc atc       4860
Lys Ile Asn Ile Leu  Ala Lys Ile Asn Leu  Leu Phe Val Ala Ile
                1560                1565                1570

ttc aca ggc gag tgt  att gtc aag ctg gct  gcc ctg cgc cac tac       4905
Phe Thr Gly Glu Cys  Ile Val Lys Leu Ala  Ala Leu Arg His Tyr
                1575                1580                1585
```

```
tac ttc acc aac agc  tgg aat atc ttc gac  ttc gtg gtt gtc atc       4950
Tyr Phe Thr Asn Ser  Trp Asn Ile Phe Asp  Phe Val Val Val Ile
                1590                1595                1600

ctc tcc atc gtg ggc  act gtg ctc tcg gac  atc atc cag aag tac       4995
Leu Ser Ile Val Gly  Thr Val Leu Ser Asp  Ile Ile Gln Lys Tyr
                1605                1610                1615

ttc ttc tcc ccg acg  ctc ttc cga gtc atc  cgc ctg gcc cga ata       5040
Phe Phe Ser Pro Thr  Leu Phe Arg Val Ile  Arg Leu Ala Arg Ile
                1620                1625                1630

ggc cgc atc ctc aga  ctg atc cga ggg gcc  aag ggg atc cgc acg       5085
Gly Arg Ile Leu Arg  Leu Ile Arg Gly Ala  Lys Gly Ile Arg Thr
                1635                1640                1645

ctg ctc ttt gcc ctc  atg atg tcc ctg cct  gcc ctc ttc aac atc       5130
Leu Leu Phe Ala Leu  Met Met Ser Leu Pro  Ala Leu Phe Asn Ile
                1650                1655                1660

ggg ctg ctg ctc ttc  ctc gtc atg ttc atc  tac tcc atc ttt ggc       5175
Gly Leu Leu Leu Phe  Leu Val Met Phe Ile  Tyr Ser Ile Phe Gly
                1665                1670                1675

atg gcc aac ttc gct  tat gtc aag tgg gag  gct ggc atc gac gac       5220
Met Ala Asn Phe Ala  Tyr Val Lys Trp Glu  Ala Gly Ile Asp Asp
                1680                1685                1690

atg ttc aac ttc cag  acc ttc gcc aac agc  atg ctg tgc ctc ttc       5265
Met Phe Asn Phe Gln  Thr Phe Ala Asn Ser  Met Leu Cys Leu Phe
                1695                1700                1705

cag atc acc acg tcg  gcc ggc tgg gat ggc  ctc ctc agc ccc atc       5310
Gln Ile Thr Thr Ser  Ala Gly Trp Asp Gly  Leu Leu Ser Pro Ile
                1710                1715                1720

ctc aac act ggg ccg  ccc tac tgc gac ccc  act ctg ccc aac agc       5355
Leu Asn Thr Gly Pro  Pro Tyr Cys Asp Pro  Thr Leu Pro Asn Ser
                1725                1730                1735

aat ggc tct cgg ggg  gac tgc ggg agc cca  gcc gtg ggc atc ctc       5400
Asn Gly Ser Arg Gly  Asp Cys Gly Ser Pro  Ala Val Gly Ile Leu
                1740                1745                1750

ttc ttc acc acc tac  atc atc atc tcc ttc  ctc atc gtg gtc aac       5445
Phe Phe Thr Thr Tyr  Ile Ile Ile Ser Phe  Leu Ile Val Val Asn
                1755                1760                1765

atg tac att gcc atc  atc ctg gag aac ttc  agc gtg gcc acg gag       5490
Met Tyr Ile Ala Ile  Ile Leu Glu Asn Phe  Ser Val Ala Thr Glu
                1770                1775                1780

gag agc acc gag ccc  ctg agt gag gac gac  ttc gat atg ttc tat       5535
Glu Ser Thr Glu Pro  Leu Ser Glu Asp Asp  Phe Asp Met Phe Tyr
                1785                1790                1795

gag atc tgg gag aaa  ttt gac cca gag gcc  act cag ttt att gag       5580
Glu Ile Trp Glu Lys  Phe Asp Pro Glu Ala  Thr Gln Phe Ile Glu
                1800                1805                1810

tat tcg gtc ctg tct  gac ttt gcc gac gcc  ctg tct gag cca ctc       5625
Tyr Ser Val Leu Ser  Asp Phe Ala Asp Ala  Leu Ser Glu Pro Leu
                1815                1820                1825
```

```
cgt atc gcc aag ccc  aac cag ata agc ctc  atc aac atg gac ctg       5670
Arg Ile Ala Lys Pro  Asn Gln Ile Ser Leu  Ile Asn Met Asp Leu
                1830                1835                1840

ccc atg gtg agt ggg  gac cgc atc cat tgc  atg gac att ctc ttt       5715
Pro Met Val Ser Gly  Asp Arg Ile His Cys  Met Asp Ile Leu Phe
                1845                1850                1855

gcc ttc acc aaa agg  gtc ctg ggg gag tct  ggg gag atg gac gcc       5760
Ala Phe Thr Lys Arg  Val Leu Gly Glu Ser  Gly Glu Met Asp Ala
                1860                1865                1870

ctg aag atc cag atg  gag gag aag ttc atg  gca gcc aac cca tcc       5805
Leu Lys Ile Gln Met  Glu Glu Lys Phe Met  Ala Ala Asn Pro Ser
                1875                1880                1885

aag atc tcc tac gag  ccc atc acc acc aca  ctc cgg cgc aag cac       5850
Lys Ile Ser Tyr Glu  Pro Ile Thr Thr Thr  Leu Arg Arg Lys His
                1890                1895                1900

gaa gag gtg tcg gcc  atg gtt atc cag aga  gcc ttc cgc agg cac       5895
Glu Glu Val Ser Ala  Met Val Ile Gln Arg  Ala Phe Arg Arg His
                1905                1910                1915

ctg ctg caa cgc tct  ttg aag cat gcc tcc  ttc ctc ttc cgt cag       5940
Leu Leu Gln Arg Ser  Leu Lys His Ala Ser  Phe Leu Phe Arg Gln
                1920                1925                1930

cag gcg ggc agc ggc  ctc tcc gaa gag gat  gcc cct gag cga gag       5985
Gln Ala Gly Ser Gly  Leu Ser Glu Glu Asp  Ala Pro Glu Arg Glu
                1935                1940                1945

ggc ctc atc gcc tac  gtg atg agt gag aac  ttc tcc cga ccc ctt       6030
Gly Leu Ile Ala Tyr  Val Met Ser Glu Asn  Phe Ser Arg Pro Leu
                1950                1955                1960

ggc cca ccc tcc agc  tcc tcc atc tcc tcc  act tcc ttc cca ccc       6075
Gly Pro Pro Ser Ser  Ser Ser Ile Ser Ser  Thr Ser Phe Pro Pro
                1965                1970                1975

tcc tat gac agt gtc  act aga gcc acc agc  gat aac ctc cag gtg       6120
Ser Tyr Asp Ser Val  Thr Arg Ala Thr Ser  Asp Asn Leu Gln Val
                1980                1985                1990

cgg ggg tct gac tac  agc cac agt gaa gat  ctc gcc gac ttc ccc       6165
Arg Gly Ser Asp Tyr  Ser His Ser Glu Asp  Leu Ala Asp Phe Pro
                1995                2000                2005

cct tct ccg gac agg  gac cgt gag tcc atc  gtg tgagcctcgg            6208
Pro Ser Pro Asp Arg  Asp Arg Glu Ser Ile  Val
                2010                2015

cctggctggc caggacacac tgaaaagcag ccttttttcac catggcaaac ctaaatgcag   6268

tcagtcacaa accagcctgg ggccttcctg gctttgggag taagaaatgg gcctcggccc   6328

cgcggatcaa ccaggcagag ttctgtggcg ccgcgtggac agccggagca gttggcctgt   6388

gcttggaggc ctcagataga cctgtgacct ggtctggtca ggcaatgccc ctgcggctct   6448

ggaaagcaac ttcatcccag ctgctgaggc gaaatataaa actgagactg tatatgttgt   6508

gaatgggctt tcataaattt attatatttg atatttttttt acttgagcaa agaactaagg   6568
```

attttccat ggacatgggc agcaattcac gctgtctctt cttaaccctg aacaagagtg 6628
tctatggagc agccggaagt ctgttctcaa agcagaaagtg gaatccagtg tggctcccac 6688
aggtcttcac tgcccagggg tcgaatgggg tcccctccc acttgacctg agatgctggg 6748
agggctgaac ccccactcac acaagcacac acacacacag tcctcacaca cggaggccag 6808
acacaggccg tgggacccag gctcccagcc taagggagac aggcctttcc ctgccggccc 6868
cccaaggatg gggttcttgt ccacggggct cactctggcc ccctattgtc tcccaaggtc 6928
ccattttccc ccttgtgttt tcacgcaggt catattgtca gtcctacaaa aataaaaggc 6988
ttccagagga gagtggcctg gggtcccagg gctgggccnt aggcactgat agttgccttt 7048
tcttcccctc ctgtaagagt attaacaaaa ccaaaggaca caagggtgca agccccattc 7108
acggcctggc atgcagcttg tccttgctcc tggaacctgg caggccctgc cagccagcca 7168
atggaagaga ggggctgagc catgggggtt tggggctaag aagttcacca gccctgagcc 7228
atggsnsccc tcagcctgcc tgaagagagg aaactggcga tctcccaggg ctctctggac 7288
catacncgga ggagttttcn ngtgtggtct ccagctcctc tccagacaca gagacatggg 7348
agtggggagc ggacgttggc cctggccctg tgcagggaaa gggatggtca ggcccagttc 7408
tcgtgcccct tagaggggaa tgaaccatgg cacctttgag agaggggnca ctgtggtcag 7468
gcccagcctc tctggcnnag tcccgggatc ctgatggcac ccacacagag gacctctttg 7528
gggcaagatc caggtggntc ccataggtct tgtgaaaagg ctttttcagg gaaaaatatt 7588
ttactagtcc aatcaccccc aggacctctt cagctgctga caatcctatt tagcatatgc 7648
aaatctttta acatagagaa ctgtcaccct gaggtaacag ggtcaactgg cgaagagcag 7708
gccaggggnc ttggctgnnc cattccagct ctnccacnga nnncctccwm ncnnnnncat 7768
nnctcccagg ccacctcagt ctcanctgcc ggctctgggc tggctnctcc taacctacct 7828
nnccgagctg tcggagggct ggacatttgt ggcagtgctg aanggggcat tgsnggcgag 7888
taaagtatta kgtttcttct tgtcacccca gttcccttgg tggcaacccc agacccaacc 7948
catgcccctg acagatctag ttctcttcts ctgtgttccc tttgagtccn gtgtgggaca 8008
cggtttaact gtcccagcga gatttctcca agtngaaatc ctatttttgt agatctccat 8068
gctttgnctc tcaaggcttg gagaggtatg tgcccctcct nggbnctcac cgcctgctac 8128
acaggcagga atgcggnttg ggaggcaggt cgggctssna gcccagctgg ccggaaggag 8188
actgtggttt ttgtgtgtgt ggacagcncg ggagctttga gacaggntgc ctggggctgg 8248
ctgcagacgg tgtggttggg ggtgggaggt gagctagacc nnncccttag cttttagcct 8308
ggctgtcacc tttttaattt ccagaactgc acaatgacca gnaggagggg agaagagagt 8368
aggaaaaagg agggaaggac agacatcaag tgccagatgt tgtctgaact aatcgagcac 8428
ttctcaccaa acttcnngta taaataaaat acatannnng gggcaaacca ataaatggct 8488

tac 8491

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

<400> 2

Met Ala Asn Phe Leu Leu Pro Arg Gly Thr Ser Ser Phe Arg Arg Phe
1 5 10 15

Thr Arg Glu Ser Leu Ala Ala Ile Glu Lys Arg Met Ala Glu Lys Gln
20 25 30

Ala Arg Gly Ser Thr Thr Leu Gln Glu Ser Arg Glu Gly Leu Pro Glu
35 40 45

Glu Glu Ala Pro Arg Pro Gln Leu Asp Leu Gln Ala Ser Lys Lys Leu
50 55 60

Pro Asp Leu Tyr Gly Asn Pro Pro Gln Glu Leu Ile Gly Glu Pro Leu
65 70 75 80

Glu Asp Leu Asp Pro Phe Tyr Ser Thr Gln Lys Thr Phe Ile Val Leu
85 90 95

Asn Lys Gly Lys Thr Ile Phe Arg Phe Ser Ala Thr Asn Ala Leu Tyr
100 105 110

Val Leu Ser Pro Phe His Pro Val Arg Arg Ala Ala Val Lys Ile Leu
115 120 125

Val His Ser Leu Phe Asn Met Leu Ile Met Cys Thr Ile Leu Thr Asn
130 135 140

Cys Val Phe Met Ala Gln His Asp Pro Pro Pro Trp Thr Lys Tyr Val
145 150 155 160

Glu Tyr Thr Phe Thr Ala Ile Tyr Thr Phe Glu Ser Leu Val Lys Ile
165 170 175

Leu Ala Arg Ala Phe Cys Leu His Ala Phe Thr Phe Leu Arg Asp Pro
180 185 190

Trp Asn Trp Leu Asp Phe Ser Val Ile Ile Met Ala Tyr Thr Thr Glu
195 200 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ala Leu Ala Arg Ile Gln Arg Gly Leu Arg Phe Val Lys Arg Thr
965 970 975

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Gly Ala Leu Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Leu Glu Glu Arg Lys
1220 1225 1230

Thr Ile Lys Val Leu Leu Glu Tyr Ala Asp Lys Met Phe Thr Tyr
1235 1240 1245

Val Phe Val Leu Glu Met Leu Leu Lys Trp Val Ala Tyr Gly Phe
1250 1255 1260

Lys Lys Tyr Phe Thr Asn Ala Trp Cys Trp Leu Asp Phe Leu Ile
1265 1270 1275

Val Asp Val Ser Leu Val Ser Leu Val Ala Asn Thr Leu Gly Phe
1280 1285 1290

Ala Glu Met Gly Pro Ile Lys Ser Leu Arg Thr Leu Arg Ala Leu
1295 1300 1305

Arg Pro Leu Arg Ala Leu Ser Arg Phe Glu Gly Met Arg Val Val
1310 1315 1320

Val Asn Ala Leu Val Gly Ala Ile Pro Ser Ile Met Asn Val Leu
1325 1330 1335

Leu Val Cys Leu Ile Phe Trp Leu Ile Phe Ser Ile Met Gly Val
1340 1345 1350

Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Gly Arg Cys Ile Asn Gln Thr Glu
1355 1360 1365

Gly Asp Leu Pro Leu Asn Tyr Thr Ile Val Asn Asn Lys Ser Gln
1370 1375 1380

Cys Glu Ser Leu Asn Leu Thr Gly Glu Leu Tyr Trp Thr Lys Val
1385 1390 1395

Lys Val Asn Phe Asp Asn Val Gly Ala Gly Tyr Leu Ala Leu Leu
1400 1405 1410

Gln Val Ala Thr Phe Lys Gly Trp Met Asp Ile Met Tyr Ala Ala
1415 1420 1425

Val Asp Ser Arg Gly Tyr Glu Glu Gln Pro Gln Trp Glu Tyr Asn
1430 1435 1440

Leu Tyr Met Tyr Ile Tyr Phe Val Ile Phe Ile Ile Phe Gly Ser
1445 1450 1455

Phe Phe Thr Leu Asn Leu Phe Ile Gly Val Ile Ile Asp Asn Phe
1460 1465 1470

Asn Gln Gln Lys Lys Lys Leu Gly Gly Gln Asp Ile Phe Met Thr
1475 1480 1485

Glu Glu Gln Lys Lys Tyr Tyr Asn Ala Met Lys Lys Leu Gly Ser
1490 1495 1500

Lys Lys Pro Gln Lys Pro Ile Pro Arg Pro Leu Asn Lys Tyr Gln
1505 1510 1515

Gly Phe Ile Phe Asp Ile Val Thr Lys Gln Ala Phe Asp Val Thr
1520 1525 1530

Ile Met Phe Leu Ile Cys Leu Asn Met Val Thr Met Met Val Glu
1535 1540 1545

Thr Asp Asp Gln Ser Pro Glu Lys Ile Asn Ile Leu Ala Lys Ile
1550 1555 1560

Asn Leu Leu Phe Val Ala Ile Phe Thr Gly Glu Cys Ile Val Lys
1565 1570 1575

Leu Ala Ala Leu Arg His Tyr Tyr Phe Thr Asn Ser Trp Asn Ile
1580 1585 1590

Phe Asp Phe Val Val Val Ile Leu Ser Ile Val Gly Thr Val Leu
1595 1600 1605

Ser Asp Ile Ile Gln Lys Tyr Phe Phe Ser Pro Thr Leu Phe Arg
1610 1615 1620

Val Ile Arg Leu Ala Arg Ile Gly Arg Ile Leu Arg Leu Ile Arg
1625 1630 1635

Gly Ala Lys Gly Ile Arg Thr Leu Leu Phe Ala Leu Met Met Ser
1640 1645 1650

Leu Pro Ala Leu Phe Asn Ile Gly Leu Leu Leu Phe Leu Val Met
1655 1660 1665

Phe Ile Tyr Ser Ile Phe Gly Met Ala Asn Phe Ala Tyr Val Lys
1670 1675 1680

Trp Glu Ala Gly Ile Asp Asp Met Phe Asn Phe Gln Thr Phe Ala
1685 1690 1695

Asn Ser Met Leu Cys Leu Phe Gln Ile Thr Thr Ser Ala Gly Trp
1700 1705 1710

Asp Gly Leu Leu Ser Pro Ile Leu Asn Thr Gly Pro Pro Tyr Cys
1715 1720 1725

Asp Pro Thr Leu Pro Asn Ser Asn Gly Ser Arg Gly Asp Cys Gly
1730 1735 1740

Ser Pro Ala Val Gly Ile Leu Phe Phe Thr Thr Tyr Ile Ile Ile
1745 1750 1755

Ser Phe Leu Ile Val Val Asn Met Tyr Ile Ala Ile Ile Leu Glu
1760 1765 1770

Asn Phe Ser Val Ala Thr Glu Glu Ser Thr Glu Pro Leu Ser Glu
1775 1780 1785

Asp Asp Phe Asp Met Phe Tyr Glu Ile Trp Glu Lys Phe Asp Pro
1790 1795 1800

Glu Ala Thr Gln Phe Ile Glu Tyr Ser Val Leu Ser Asp Phe Ala
1805 1810 1815

Asp Ala Leu Ser Glu Pro Leu Arg Ile Ala Lys Pro Asn Gln Ile
1820 1825 1830

Ser Leu Ile Asn Met Asp Leu Pro Met Val Ser Gly Asp Arg Ile
1835 1840 1845

His Cys Met Asp Ile Leu Phe Ala Phe Thr Lys Arg Val Leu Gly
1850 1855 1860

Glu Ser Gly Glu Met Asp Ala Leu Lys Ile Gln Met Glu Glu Lys
1865 1870 1875

Phe Met Ala Ala Asn Pro Ser Lys Ile Ser Tyr Glu Pro Ile Thr
1880 1885 1890

Thr Thr Leu Arg Arg Lys His Glu Glu Val Ser Ala Met Val Ile
1895 1900 1905

Gln Arg Ala Phe Arg Arg His Leu Leu Gln Arg Ser Leu Lys His
1910 1915 1920

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

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

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

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

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

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

Ser Ile  Val
    2015
```

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

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

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

<400> 3

```
gccgctgagc ctgcgcccag tgccccgagc cccgccgccga gccgagtccg cgccaagcag     60

cagccgccca ccccggggcc cggccggggg accagcagct tccccacagg caacgtgagg    120

agagcctgtg cccagaagca ggatgagaag atg gca aac ttc cta tta cct cgg      174
                                Met Ala Asn Phe Leu Leu Pro Arg
                                1               5

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

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

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

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

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

acc caa aag act ttc atc gta ctg aat aaa ggc aag acc atc ttc cgg      462
Thr Gln Lys Thr Phe Ile Val Leu Asn Lys Gly Lys Thr Ile Phe Arg
    90                  95                  100

ttc agt gcc acc aac gcc ttg tat gtc ctc agt ccc ttc cac cca gtt      510
Phe Ser Ala Thr Asn Ala Leu Tyr Val Leu Ser Pro Phe His Pro Val
105                 110                 115                 120

cgg aga gcg gct gtg aag att ctg gtt cac tcg ctc ttc aac atg ctc      558
Arg Arg Ala Ala Val Lys Ile Leu Val His Ser Leu Phe Asn Met Leu
                125                 130                 135

atc atg tgc acc atc ctc acc aac tgc gtg ttc atg gcc cag cac gac      606
Ile Met Cys Thr Ile Leu Thr Asn Cys Val Phe Met Ala Gln His Asp
            140                 145                 150

cct cca ccc tgg acc aag tat gtc gag tac acc ttc acc gcc att tac      654
Pro Pro Pro Trp Thr Lys Tyr Val Glu Tyr Thr Phe Thr Ala Ile Tyr
        155                 160                 165

acc ttt gag tct ctg gtc aag att ctg gct cga gct ttc tgc ctg cac      702
Thr Phe Glu Ser Leu Val Lys Ile Leu Ala Arg Ala Phe Cys Leu His
    170                 175                 180

gcg ttc act ttc ctt cgg gac cca tgg aac tgg ctg gac ttt agt gtg      750
Ala Phe Thr Phe Leu Arg Asp Pro Trp Asn Trp Leu Asp Phe Ser Val
185                 190                 195                 200

att atc atg gca tac aca act gaa ttt gtg gac ctg ggc aat gtc tca      798
Ile Ile Met Ala Tyr Thr Thr Glu Phe Val Asp Leu Gly Asn Val Ser
                205                 210                 215

gcc tta cgc acc ttc cga gtc ctc cgg gcc ctg aaa act ata tca gtc      846
Ala Leu Arg Thr Phe Arg Val Leu Arg Ala Leu Lys Thr Ile Ser Val
            220                 225                 230

att tca ggg ctg aag acc atc gtg ggg gcc ctg atc cag tct gtg aag      894
Ile Ser Gly Leu Lys Thr Ile Val Gly Ala Leu Ile Gln Ser Val Lys
        235                 240                 245

aag ctg gct gat gtg atg gtc ctc aca gtc ttc tgc ctc agc gtc ttt      942
Lys Leu Ala Asp Val Met Val Leu Thr Val Phe Cys Leu Ser Val Phe
    250                 255                 260

gcc ctc atc ggc ctg cag ctc ttc atg ggc aac cta agg cac aag tgt      990
Ala Leu Ile Gly Leu Gln Leu Phe Met Gly Asn Leu Arg His Lys Cys
265                 270                 275                 280

gtg cgc aac ttc aca gcg ctc aac ggc acc aac ggc tcc gtg gag gcc     1038
Val Arg Asn Phe Thr Ala Leu Asn Gly Thr Asn Gly Ser Val Glu Ala
                285                 290                 295

gac ggc ttg gtc tgg gaa tcc ctg gac ctt tac ctc agt gat cca gaa     1086
Asp Gly Leu Val Trp Glu Ser Leu Asp Leu Tyr Leu Ser Asp Pro Glu
            300                 305                 310

aat tac ctg ctc aag aac ggc acc tct gat gtg tta ctg tgt ggg aac     1134
Asn Tyr Leu Leu Lys Asn Gly Thr Ser Asp Val Leu Leu Cys Gly Asn
        315                 320                 325
```

```
agc tct gac gct ggg aca tgt ccg gag ggc tac cgg tgc cta aag gca     1182
Ser Ser Asp Ala Gly Thr Cys Pro Glu Gly Tyr Arg Cys Leu Lys Ala
    330                 335                 340

ggc gag aac ccc gac cac ggc tac acc agc ttc gat tcc ttt gcc tgg     1230
Gly Glu Asn Pro Asp His Gly Tyr Thr Ser Phe Asp Ser Phe Ala Trp
345                 350                 355                 360

gcc ttt ctt gca ctc ttc cgc ctg atg acg cag gac tgc tgg gag cgc     1278
Ala Phe Leu Ala Leu Phe Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Trp Glu Arg
                365                 370                 375

ctc tat cag cag acc ctc agg tcc gca ggg aag atc tac atg atc ttc     1326
Leu Tyr Gln Gln Thr Leu Arg Ser Ala Gly Lys Ile Tyr Met Ile Phe
            380                 385                 390

ttc atg ctt gtc atc ttc ctg ggg tcc ttc tac ctg gtg aac ctg atc     1374
Phe Met Leu Val Ile Phe Leu Gly Ser Phe Tyr Leu Val Asn Leu Ile
        395                 400                 405

ctg gcc gtg gtc gca atg gcc tat gag gag caa aac caa gcc acc atc     1422
Leu Ala Val Val Ala Met Ala Tyr Glu Glu Gln Asn Gln Ala Thr Ile
    410                 415                 420

gct gag acc gag gag aag gaa aag cgc ttc cag gag gcc atg gaa atg     1470
Ala Glu Thr Glu Glu Lys Glu Lys Arg Phe Gln Glu Ala Met Glu Met
425                 430                 435                 440

ctc aag aaa gaa cac gag gcc ctc acc atc agg ggt gtg gat acc gtg     1518
Leu Lys Lys Glu His Glu Ala Leu Thr Ile Arg Gly Val Asp Thr Val
                445                 450                 455

tcc cgt agc tcc ttg gag atg tcc cct ttg gcc cca gta aac agc cat     1566
Ser Arg Ser Ser Leu Glu Met Ser Pro Leu Ala Pro Val Asn Ser His
            460                 465                 470

gag aga aga agc aag agg aga aaa cgg atg tct tca gga act gag gag     1614
Glu Arg Arg Ser Lys Arg Arg Lys Arg Met Ser Ser Gly Thr Glu Glu
        475                 480                 485

tgt ggg gag gac agg ctc ccc aag tct gac tca gaa gat ggt ccc aga     1662
Cys Gly Glu Asp Arg Leu Pro Lys Ser Asp Ser Glu Asp Gly Pro Arg
    490                 495                 500

gca atg aat cat ctc agc ctc acc cgt ggc ctc agc agg act tct atg     1710
Ala Met Asn His Leu Ser Leu Thr Arg Gly Leu Ser Arg Thr Ser Met
505                 510                 515                 520

aag cca cgt tcc agc cgc ggg agc att ttc acc ttt cgc agg cga gac     1758
Lys Pro Arg Ser Ser Arg Gly Ser Ile Phe Thr Phe Arg Arg Arg Asp
                525                 530                 535

ctg ggt tct gaa gca gat ttt gca gat gat gaa aac agc aca gcg cgg     1806
Leu Gly Ser Glu Ala Asp Phe Ala Asp Asp Glu Asn Ser Thr Ala Arg
            540                 545                 550

gag agc gag agc cac cac aca tca ctg ctg gtg ccc tgg ccc ctg cgc     1854
Glu Ser Glu Ser His His Thr Ser Leu Leu Val Pro Trp Pro Leu Arg
        555                 560                 565

cgg acc agt gcc cag gga cag ccc agt ccc gga acc tcg gct cct ggc     1902
Arg Thr Ser Ala Gln Gly Gln Pro Ser Pro Gly Thr Ser Ala Pro Gly
    570                 575                 580
```

```
cac gcc ctc cat ggc aaa aag aac agc act gtg gac tgc aat ggg gtg     1950
His Ala Leu His Gly Lys Lys Asn Ser Thr Val Asp Cys Asn Gly Val
585                 590                 595                 600

gtc tca tta ctg ggg gca ggc gac cca gag gcc aca tcc cca gga agc     1998
Val Ser Leu Leu Gly Ala Gly Asp Pro Glu Ala Thr Ser Pro Gly Ser
                605                 610                 615

cac ctc ctc cgc cct gtg atg cta gag cac ccg cca gac acg acc acg     2046
His Leu Leu Arg Pro Val Met Leu Glu His Pro Pro Asp Thr Thr Thr
            620                 625                 630

cca tcg gag gag cca ggc ggc ccc cag atg ctg acc tcc cag gct ccg     2094
Pro Ser Glu Glu Pro Gly Gly Pro Gln Met Leu Thr Ser Gln Ala Pro
        635                 640                 645

tgt gta gat ggc ttc gag gag cca gga gca cgg cag cgg gcc ctc agc     2142
Cys Val Asp Gly Phe Glu Glu Pro Gly Ala Arg Gln Arg Ala Leu Ser
    650                 655                 660

gca gtc agc gtc ctc aca agc gca ctg gaa gag tta gag gag tct cgc     2190
Ala Val Ser Val Leu Thr Ser Ala Leu Glu Glu Leu Glu Glu Ser Arg
665                 670                 675                 680

cac aag tgt cca cca tgc tgg aac cgt ctc gcc cag cgc tac ctg atc     2238
His Lys Cys Pro Pro Cys Trp Asn Arg Leu Ala Gln Arg Tyr Leu Ile
                685                 690                 695

tgg gag tgc tgc ccg ctg tgg atg tcc atc aag cag gga gtg aag ttg     2286
Trp Glu Cys Cys Pro Leu Trp Met Ser Ile Lys Gln Gly Val Lys Leu
            700                 705                 710

gtg gtc atg gac ccg ttt act gac ctc acc atc act atg tgc atc gta     2334
Val Val Met Asp Pro Phe Thr Asp Leu Thr Ile Thr Met Cys Ile Val
        715                 720                 725

ctc aac aca ctc ttc atg gcg ctg gag cac tac aac atg aca agt gaa     2382
Leu Asn Thr Leu Phe Met Ala Leu Glu His Tyr Asn Met Thr Ser Glu
    730                 735                 740

ttc gag gag atg ctg cag gtc gga aac ctg gtc ttc aca ggg att ttc     2430
Phe Glu Glu Met Leu Gln Val Gly Asn Leu Val Phe Thr Gly Ile Phe
745                 750                 755                 760

aca gca gag atg acc ttc aag atc att gcc ctc gac ccc tac tac tac     2478
Thr Ala Glu Met Thr Phe Lys Ile Ile Ala Leu Asp Pro Tyr Tyr Tyr
                765                 770                 775

ttc caa cag ggc tgg aac atc ttc gac agc atc atc gtc atc ctt agc     2526
Phe Gln Gln Gly Trp Asn Ile Phe Asp Ser Ile Ile Val Ile Leu Ser
            780                 785                 790

ctc atg gag ctg ggc ctg tcc cgc atg agc aac ttg tcg gtg ctg cgc     2574
Leu Met Glu Leu Gly Leu Ser Arg Met Ser Asn Leu Ser Val Leu Arg
        795                 800                 805

tcc ttc cgc ctg ctg cgg gtc ttc aag ctg gcc aaa tca tgg ccc acc     2622
Ser Phe Arg Leu Leu Arg Val Phe Lys Leu Ala Lys Ser Trp Pro Thr
    810                 815                 820

ctg aac aca ctc atc aag atc atc ggg aac tca gtg ggg gca ctg ggg     2670
Leu Asn Thr Leu Ile Lys Ile Ile Gly Asn Ser Val Gly Ala Leu Gly
825                 830                 835                 840
```

```
aac ctg aca ctg gtg cta gcc atc atc gtg ttc atc ttt gct gtg gtg     2718
Asn Leu Thr Leu Val Leu Ala Ile Ile Val Phe Ile Phe Ala Val Val
                845                 850                 855

ggc atg cag ctc ttt ggc aag aac tac tcg gag ctg agg gac agc gac     2766
Gly Met Gln Leu Phe Gly Lys Asn Tyr Ser Glu Leu Arg Asp Ser Asp
            860                 865                 870

tca ggc ctg ctg cct cgc tgg cac atg atg gac ttc ttt cat gcc ttc     2814
Ser Gly Leu Leu Pro Arg Trp His Met Met Asp Phe Phe His Ala Phe
        875                 880                 885

cta atc atc ttc cgc atc ctc tgt gga gag tgg atc gag acc atg tgg     2862
Leu Ile Ile Phe Arg Ile Leu Cys Gly Glu Trp Ile Glu Thr Met Trp
    890                 895                 900

gac tgc atg gag gtg tcg ggg cag tca tta tgc ctg ctg gtc ttc ttg     2910
Asp Cys Met Glu Val Ser Gly Gln Ser Leu Cys Leu Leu Val Phe Leu
905                 910                 915                 920

ctt gtt atg gtc att ggc aac ctt gtg gtc ctg aat ctc ttc ctg gcc     2958
Leu Val Met Val Ile Gly Asn Leu Val Val Leu Asn Leu Phe Leu Ala
                925                 930                 935

ttg ctg ctc agc tcc ttc agt gca gac aac ctc aca gcc cct gat gag     3006
Leu Leu Leu Ser Ser Phe Ser Ala Asp Asn Leu Thr Ala Pro Asp Glu
            940                 945                 950

gac aga gag atg aac aac ctc cag ctg gcc ctg gcc cgc atc cag agg     3054
Asp Arg Glu Met Asn Asn Leu Gln Leu Ala Leu Ala Arg Ile Gln Arg
        955                 960                 965

ggc ctg cgc ttt gtc aag cgg acc acc tgg gat ttc tgc tgt ggt ctc     3102
Gly Leu Arg Phe Val Lys Arg Thr Thr Trp Asp Phe Cys Cys Gly Leu
    970                 975                 980

ctg cgg cac cgg cct cag aag ccc gca gcc ctt gcc gcc cag ggc cag     3150
Leu Arg His Arg Pro Gln Lys Pro Ala Ala Leu Ala Ala Gln Gly Gln
985                 990                 995                 1000

ctg ccc agc tgc att  gcc acc ccc tac tcc  ccg cca ccc cca gag       3195
Leu Pro Ser Cys Ile  Ala Thr Pro Tyr Ser  Pro Pro Pro Pro Glu
                1005                1010                1015

acg gag aag gtg cct  ccc acc cgc aag gaa  aca cag ttt gag gaa       3240
Thr Glu Lys Val Pro  Pro Thr Arg Lys Glu  Thr Gln Phe Glu Glu
            1020                1025                1030

ggc gag caa cca ggc  cag ggc acc ccc ggg  gat cca gag ccc gtg       3285
Gly Glu Gln Pro Gly  Gln Gly Thr Pro Gly  Asp Pro Glu Pro Val
        1035                1040                1045

tgt gtg ccc atc gct  gtg gcc gag tca gac  aca gat gac caa gaa       3330
Cys Val Pro Ile Ala  Val Ala Glu Ser Asp  Thr Asp Asp Gln Glu
    1050                1055                1060

gag gat gag gag aac  agc ctg ggc acg gag  gag gag tcc agc aag       3375
Glu Asp Glu Glu Asn  Ser Leu Gly Thr Glu  Glu Glu Ser Ser Lys
1065                1070                1075

cag cag gaa tcc cag  cct gtg tcc ggc tgg  ccc aga ggc cct ccg       3420
Gln Gln Glu Ser Gln  Pro Val Ser Gly Trp  Pro Arg Gly Pro Pro
            1080                1085                1090
```

```
gat tcc agg acc tgg  agc cag gtg tca gcg  act gcc tac tct gag       3465
Asp Ser Arg Thr Trp  Ser Gln Val Ser Ala  Thr Ala Tyr Ser Glu
                1095                 1100                 1105

gcc gag gcc agt gca  tct cag gcc gac tgg  cgg cag cag tgg aaa       3510
Ala Glu Ala Ser Ala  Ser Gln Ala Asp Trp  Arg Gln Gln Trp Lys
                1110                 1115                 1120

gcg gaa ccc cag gcc  cca ggg tgc ggt gag  acc cca gag gac agt       3555
Ala Glu Pro Gln Ala  Pro Gly Cys Gly Glu  Thr Pro Glu Asp Ser
                1125                 1130                 1135

tgc tcc gag ggc agc  aca gca gac atg acc  aac acc gct gag ctc       3600
Cys Ser Glu Gly Ser  Thr Ala Asp Met Thr  Asn Thr Ala Glu Leu
                1140                 1145                 1150

ctg gag cag atc cct  gac ctc ggc cag gat  gtc aag gac cca gag       3645
Leu Glu Gln Ile Pro  Asp Leu Gly Gln Asp  Val Lys Asp Pro Glu
                1155                 1160                 1165

gac tgc ttc act gaa  ggc tgt gtc cgg cgc  tgt ccc tgc tgt gcg       3690
Asp Cys Phe Thr Glu  Gly Cys Val Arg Arg  Cys Pro Cys Cys Ala
                1170                 1175                 1180

gtg gac acc aca cag  gcc cca ggg aag gtc  tgg tgg cgg ttg cgc       3735
Val Asp Thr Thr Gln  Ala Pro Gly Lys Val  Trp Trp Arg Leu Arg
                1185                 1190                 1195

aag acc tgc tac cac  atc gtg gag cac agc  tgg ttc gag aca ttc       3780
Lys Thr Cys Tyr His  Ile Val Glu His Ser  Trp Phe Glu Thr Phe
                1200                 1205                 1210

atc atc ttc atg atc  cta ctc agc agt gga  gcg ctg gcc ttc gag       3825
Ile Ile Phe Met Ile  Leu Leu Ser Ser Gly  Ala Leu Ala Phe Glu
                1215                 1220                 1225

gac atc tac cta gag  gag cgg aag acc atc  aag gtt ctg ctt gag       3870
Asp Ile Tyr Leu Glu  Glu Arg Lys Thr Ile  Lys Val Leu Leu Glu
                1230                 1235                 1240

tat gcc gac aag atg  ttc aca tat gtc ttc  gtg ctg gag atg ctg       3915
Tyr Ala Asp Lys Met  Phe Thr Tyr Val Phe  Val Leu Glu Met Leu
                1245                 1250                 1255

ctc aag tgg gtg gcc  tac ggc ttc aag aag  tac ttc acc aat gcc       3960
Leu Lys Trp Val Ala  Tyr Gly Phe Lys Lys  Tyr Phe Thr Asn Ala
                1260                 1265                 1270

tgg tgc tgg ctc gac  ttc ctc atc gta gac  gtc tct ctg gtc agc       4005
Trp Cys Trp Leu Asp  Phe Leu Ile Val Asp  Val Ser Leu Val Ser
                1275                 1280                 1285

ctg gtg gcc aac acc  ctg ggc ttt gcc gag  atg ggc ccc atc aag       4050
Leu Val Ala Asn Thr  Leu Gly Phe Ala Glu  Met Gly Pro Ile Lys
                1290                 1295                 1300

tca ctg cgg acg ctg  cgt gca ctc cgt cct  ctg aga gct ctg tca       4095
Ser Leu Arg Thr Leu  Arg Ala Leu Arg Pro  Leu Arg Ala Leu Ser
                1305                 1310                 1315

cga ttt gag ggc atg  agg gtg gtg gtc aat  gcc ctg gtg ggc gcc       4140
Arg Phe Glu Gly Met  Arg Val Val Val Asn  Ala Leu Val Gly Ala
                1320                 1325                 1330
```

```
atc ccg tcc atc atg  aac gtc ctc ctc gtc  tgc ctc atc ttc tgg       4185
Ile Pro Ser Ile Met  Asn Val Leu Leu Val  Cys Leu Ile Phe Trp
                1335                1340                1345

ctc atc ttc agc atc  atg ggc gtg aac ctc  ttt gcg ggg aag ttt       4230
Leu Ile Phe Ser Ile  Met Gly Val Asn Leu  Phe Ala Gly Lys Phe
                1350                1355                1360

ggg agg tgc atc aac  cag aca gag gga gac  ttg cct ttg aac tac       4275
Gly Arg Cys Ile Asn  Gln Thr Glu Gly Asp  Leu Pro Leu Asn Tyr
                1365                1370                1375

acc atc gtg aac aac  aag agc cag tgt gag  tcc ttg aac ttg acc       4320
Thr Ile Val Asn Asn  Lys Ser Gln Cys Glu  Ser Leu Asn Leu Thr
                1380                1385                1390

gga gaa ttg tac tgg  acc aag gtg aaa gtc  aac ttt gac aac gtg       4365
Gly Glu Leu Tyr Trp  Thr Lys Val Lys Val  Asn Phe Asp Asn Val
                1395                1400                1405

ggg gcc ggg tac ctg  gcc ctt ctg cag gtg  gca aca ttt aaa ggc       4410
Gly Ala Gly Tyr Leu  Ala Leu Leu Gln Val  Ala Thr Phe Lys Gly
                1410                1415                1420

tgg atg gac att atg  tat gca gct gtg gac  tcc agg ggg tat gaa       4455
Trp Met Asp Ile Met  Tyr Ala Ala Val Asp  Ser Arg Gly Tyr Glu
                1425                1430                1435

gag cag cct cag tgg  gaa tac aac ctc tac  atg tac atc tat ttt       4500
Glu Gln Pro Gln Trp  Glu Tyr Asn Leu Tyr  Met Tyr Ile Tyr Phe
                1440                1445                1450

gtc att ttc atc atc  ttt ggg tct ttc ttc  acc ctg aac ctc ttt       4545
Val Ile Phe Ile Ile  Phe Gly Ser Phe Phe  Thr Leu Asn Leu Phe
                1455                1460                1465

att ggt gtc atc att  gac aac ttc aac caa  cag aag aaa aag tta       4590
Ile Gly Val Ile Ile  Asp Asn Phe Asn Gln  Gln Lys Lys Lys Leu
                1470                1475                1480

ggg ggc cag gac atc  ttc atg aca gag gag  cag aag aag tac tac       4635
Gly Gly Gln Asp Ile  Phe Met Thr Glu Glu  Gln Lys Lys Tyr Tyr
                1485                1490                1495

aat gcc atg aag aag  ctg ggc tcc aag aag  ccc cag aag ccc atc       4680
Asn Ala Met Lys Lys  Leu Gly Ser Lys Lys  Pro Gln Lys Pro Ile
                1500                1505                1510

cca cgg ccc ctg aac  aag tac cag ggc ttc  ata ttc gac att gtg       4725
Pro Arg Pro Leu Asn  Lys Tyr Gln Gly Phe  Ile Phe Asp Ile Val
                1515                1520                1525

acc aag cag gcc ttt  gac gtc acc atc atg  ttt ctg atc tgc ttg       4770
Thr Lys Gln Ala Phe  Asp Val Thr Ile Met  Phe Leu Ile Cys Leu
                1530                1535                1540

aat atg gtg acc atg  atg gtg gag aca gat  gac caa agt cct gag       4815
Asn Met Val Thr Met  Met Val Glu Thr Asp  Asp Gln Ser Pro Glu
                1545                1550                1555

aaa atc aac atc ttg  gcc aag atc aac ctg  ctc ttt gtg gcc atc       4860
Lys Ile Asn Ile Leu  Ala Lys Ile Asn Leu  Leu Phe Val Ala Ile
                1560                1565                1570
```

```
ttc aca ggc gag tgt  att gtc aag ctg gct  gcc ctg cgc cac tac       4905
Phe Thr Gly Glu Cys  Ile Val Lys Leu Ala  Ala Leu Arg His Tyr
                1575                1580                1585

tac ttc acc aac agc  tgg aat atc ttc gac  ttc gtg gtt gtc atc       4950
Tyr Phe Thr Asn Ser  Trp Asn Ile Phe Asp  Phe Val Val Val Ile
                1590                1595                1600

ctc tcc atc gtg ggc  act gtg ctc tcg gac  atc atc cag aag tac       4995
Leu Ser Ile Val Gly  Thr Val Leu Ser Asp  Ile Ile Gln Lys Tyr
                1605                1610                1615

ttc ttc tcc ccg acg  ctc ttc cga gtc atc  cgc ctg gcc cga ata       5040
Phe Phe Ser Pro Thr  Leu Phe Arg Val Ile  Arg Leu Ala Arg Ile
                1620                1625                1630

ggc cgc atc ctc aga  ctg atc cga ggg gcc  aag ggg atc cgc acg       5085
Gly Arg Ile Leu Arg  Leu Ile Arg Gly Ala  Lys Gly Ile Arg Thr
                1635                1640                1645

ctg ctc ttt gcc ctc  atg atg tcc ctg cct  gcc ctc ttc aac atc       5130
Leu Leu Phe Ala Leu  Met Met Ser Leu Pro  Ala Leu Phe Asn Ile
                1650                1655                1660

ggg ctg ctg ctc ttc  ctc gtc atg ttc atc  tac tcc atc ttt ggc       5175
Gly Leu Leu Leu Phe  Leu Val Met Phe Ile  Tyr Ser Ile Phe Gly
                1665                1670                1675

atg gcc aac ttc gct  tat gtc aag tgg gag  gct ggc atc gac gac       5220
Met Ala Asn Phe Ala  Tyr Val Lys Trp Glu  Ala Gly Ile Asp Asp
                1680                1685                1690

atg ttc aac ttc cag  acc ttc gcc aac agc  atg ctg tgc ctc ttc       5265
Met Phe Asn Phe Gln  Thr Phe Ala Asn Ser  Met Leu Cys Leu Phe
                1695                1700                1705

cag atc acc acg tcg  gcc ggc tgg gat ggc  ctc ctc agc ccc atc       5310
Gln Ile Thr Thr Ser  Ala Gly Trp Asp Gly  Leu Leu Ser Pro Ile
                1710                1715                1720

ctc aac act ggg ccg  ccc tac tgc gac ccc  act ctg ccc aac agc       5355
Leu Asn Thr Gly Pro  Pro Tyr Cys Asp Pro  Thr Leu Pro Asn Ser
                1725                1730                1735

aat ggc tct cgg ggg  gac tgc ggg agc cca  gcc gtg ggc atc ctc       5400
Asn Gly Ser Arg Gly  Asp Cys Gly Ser Pro  Ala Val Gly Ile Leu
                1740                1745                1750

ttc ttc acc acc tac  atc atc atc tcc ttc  ctc atc gtg gtc aac       5445
Phe Phe Thr Thr Tyr  Ile Ile Ile Ser Phe  Leu Ile Val Val Asn
                1755                1760                1765

atg tac att gcc atc  atc ctg gag aac ttc  agc gtg gcc acg gag       5490
Met Tyr Ile Ala Ile  Ile Leu Glu Asn Phe  Ser Val Ala Thr Glu
                1770                1775                1780

gag agc acc gag ccc  ctg agt gag gac gac  ttc gat atg ttc tat       5535
Glu Ser Thr Glu Pro  Leu Ser Glu Asp Asp  Phe Asp Met Phe Tyr
                1785                1790                1795

gag atc tgg gag aaa  ttt gac cca gag gcc  act cag ttt att gag       5580
Glu Ile Trp Glu Lys  Phe Asp Pro Glu Ala  Thr Gln Phe Ile Glu
                1800                1805                1810
```

```
tat tcg gtc ctg tct  gac ttt gcc gac gcc  ctg tct gag cca ctc       5625
Tyr Ser Val Leu Ser  Asp Phe Ala Asp Ala  Leu Ser Glu Pro Leu
                1815                1820                1825

cgt atc gcc aag ccc  aac cag ata agc ctc  atc aac atg gac ctg       5670
Arg Ile Ala Lys Pro  Asn Gln Ile Ser Leu  Ile Asn Met Asp Leu
                1830                1835                1840

ccc atg gtg agt ggg  gac cgc atc cat tgc  atg gac att ctc ttt       5715
Pro Met Val Ser Gly  Asp Arg Ile His Cys  Met Asp Ile Leu Phe
                1845                1850                1855

gcc ttc acc aaa agg  gtc ctg ggg gag tct  ggg gag atg gac gcc       5760
Ala Phe Thr Lys Arg  Val Leu Gly Glu Ser  Gly Glu Met Asp Ala
                1860                1865                1870

ctg aag atc cag atg  gag gag aag ttc atg  gca gcc aac cca tcc       5805
Leu Lys Ile Gln Met  Glu Glu Lys Phe Met  Ala Ala Asn Pro Ser
                1875                1880                1885

aag atc tcc tac gag  ccc atc acc acc aca  ctc cgg cgc aag cac       5850
Lys Ile Ser Tyr Glu  Pro Ile Thr Thr Thr  Leu Arg Arg Lys His
                1890                1895                1900

gaa gag gtg tcg gcc  atg gtt atc cag aga  gcc ttc cgc agg cac       5895
Glu Glu Val Ser Ala  Met Val Ile Gln Arg  Ala Phe Arg Arg His
                1905                1910                1915

ctg ctg caa cgc tct  ttg aag cat gcc tcc  ttc ctc ttc cgt cag       5940
Leu Leu Gln Arg Ser  Leu Lys His Ala Ser  Phe Leu Phe Arg Gln
                1920                1925                1930

cag gcg ggc agc ggc  ctc tcc gaa gag gat  gcc cct gag cga gag       5985
Gln Ala Gly Ser Gly  Leu Ser Glu Glu Asp  Ala Pro Glu Arg Glu
                1935                1940                1945

ggc ctc atc gcc tac  gtg atg agt gag aac  ttc tcc cga ccc ctt       6030
Gly Leu Ile Ala Tyr  Val Met Ser Glu Asn  Phe Ser Arg Pro Leu
                1950                1955                1960

ggc cca ccc tcc agc  tcc tcc atc tcc tcc  act tcc ttc cca ccc       6075
Gly Pro Pro Ser Ser  Ser Ser Ile Ser Ser  Thr Ser Phe Pro Pro
                1965                1970                1975

tcc tat gac agt gtc  act aga gcc acc agc  gat aac ctc cag gtg       6120
Ser Tyr Asp Ser Val  Thr Arg Ala Thr Ser  Asp Asn Leu Gln Val
                1980                1985                1990

cgg ggg tct gac tac  agc cac agt gaa gat  ctc gcc gac ttc ccc       6165
Arg Gly Ser Asp Tyr  Ser His Ser Glu Asp  Leu Ala Asp Phe Pro
                1995                2000                2005

cct tct ccg gac agg  gac cgt gag tcc atc  gtg tgagcctcgg            6208
Pro Ser Pro Asp Arg  Asp Arg Glu Ser Ile  Val
                2010                2015

cctggctggc caggacacac tgaaaagcag ccttttcac catggcaaac ctaaatgcag   6268

tcagtcacaa accagcctgg ggccttcctg gctttgggag taagaaatgg gcctcggccc  6328

cgcggatcaa ccaggcagag ttctgtggcg ccgcgtggac agccggagca gttggcctgt  6388

gcttggaggc ctcagataga cctgtgacct ggtctggtca ggcaatgccc ctgcggctct  6448
```

ggaaagcaac ttcatcccag ctgctgaggc gaaatataaa actgagactg tatatgttgt 6508
gaatgggctt tcataaattt attatatttg atatttttt acttgagcaa agaactaagg 6568
atttttccat ggacatgggc agcaattcac gctgtctctt cttaaccctg aacaagagtg 6628
tctatggagc agccggaagt ctgttctcaa agcagaagtg gaatccagtg tggctcccac 6688
aggtcttcac tgcccagggg tcgaatgggg tccccctccc acttgacctg agatgctggg 6748
agggctgaac ccccactcac acaagcacac acacacacag tcctcacaca cggaggccag 6808
acacaggccg tgggacccag gctcccagcc taagggagac aggcctttcc ctgccggccc 6868
cccaaggatg gggttcttgt ccacggggct cactctggcc ccctattgtc tcccaaggtc 6928
ccattttccc ccttgtgttt tcacgcaggt catattgtca gtcctacaaa aataaaaggc 6988
ttccagagga gagtggcctg gggtcccagg gctgggccnt aggcactgat agttgccttt 7048
tcttccccte ctgtaagagt attaacaaaa ccaaaggaca caagggtgca agccccattc 7108
acggcctggc atgcagcttg tccttgctcc tggaacctgg caggccctgc cagccagcca 7168
atggaagaga ggggctgagc catgggggtt tggggctaag aagttcacca gccctgagcc 7228
atggsnsccc tcagcctgcc tgaagagagg aaactggcga tctcccaggg ctctctggac 7288
catacncgga ggagttttcn ngtgtggtct ccagctcctc tccagacaca gagacatggg 7348
agtggggagc ggacgttggc cctggccctg tgcagggaaa gggatggtca ggcccagttc 7408
tcgtgcccct tagaggggaa tgaaccatgg caccttgag agaggggca ctgtggtcag 7468
gcccagcctc tctggcnnag tcccgggatc ctgatggcac ccacacagag gacctctttg 7528
gggcaagatc caggtggntc ccataggtct tgtgaaaagg ctttttcagg gaaaaatatt 7588
ttactagtcc aatcaccccc aggacctctt cagctgctga caatcctatt tagcatatgc 7648
aaatctttta acatagagaa ctgtcaccct gaggtaacag ggtcaactgg cgaagagcag 7708
gccagggggc ttggctgnnc cattccagct ctnccacnga nnncctccwm ncnnnnncat 7768
nnctcccagg ccacctcagt ctcanctgcc ggctctgggc tggctnctcc taacctacct 7828
nnccgagctg tcggagggct ggacatttgt ggcagtgctg aanggggcat tgsnggcgag 7888
taaagtatta kgtttcttct tgtcacccca gttcccttgg tggcaacccc agacccaacc 7948
catgcccctg acagatctag ttctcttcts ctgtgttccc tttgagtccn gtgtgggaca 8008
cggtttaact gtcccagcga gatttctcca agtngaaatc ctatttttgt agatctccat 8068
gctttgnctc tcaaggcttg gagaggtatg tgcccctcct nggbnctcac cgcctgctac 8128
acaggcagga atgcggnttg ggaggcaggt cgggctssna gcccagctgg ccggaaggag 8188
actgtggttt ttgtgtgtgt ggacagcncg ggagctttga gacaggntgc ctggggctgg 8248
ctgcagacgg tgtggttggg ggtgggaggt gagctagacc nnncccttag cttttagcct 8308
ggctgtcacc tttttaattt ccagaactgc acaatgacca gnaggagggg agaagagagt 8368

aggaaaaagg agggaaggac agacatcaag tgccagatgt tgtctgaact aatcgagcac 8428

ttctcaccaa acttcnngta taaataaaat acatannnng gggcaaacca ataaatggct 8488

tac 8491

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

<400> 4

Met Ala Asn Phe Leu Leu Pro Arg Gly Thr Ser Ser Phe Arg Arg Phe
1 5 10 15

Thr Arg Glu Ser Leu Ala Ala Ile Glu Lys Arg Met Ala Glu Lys Gln
20 25 30

Ala Arg Gly Ser Thr Thr Leu Gln Glu Ser Arg Glu Gly Leu Pro Glu
35 40 45

Glu Glu Ala Pro Arg Pro Gln Leu Asp Leu Gln Ala Ser Lys Lys Leu
50 55 60

Pro Asp Leu Tyr Gly Asn Pro Pro Gln Glu Leu Ile Gly Glu Pro Leu
65 70 75 80

Glu Asp Leu Asp Pro Phe Tyr Ser Thr Gln Lys Thr Phe Ile Val Leu
85 90 95

Asn Lys Gly Lys Thr Ile Phe Arg Phe Ser Ala Thr Asn Ala Leu Tyr
100 105 110

Val Leu Ser Pro Phe His Pro Val Arg Arg Ala Ala Val Lys Ile Leu
115 120 125

Val His Ser Leu Phe Asn Met Leu Ile Met Cys Thr Ile Leu Thr Asn
130 135 140

Cys Val Phe Met Ala Gln His Asp Pro Pro Pro Trp Thr Lys Tyr Val
145 150 155 160

Glu Tyr Thr Phe Thr Ala Ile Tyr Thr Phe Glu Ser Leu Val Lys Ile
165 170 175

Leu Ala Arg Ala Phe Cys Leu His Ala Phe Thr Phe Leu Arg Asp Pro
180 185 190

```
Trp Asn Trp Leu Asp Phe Ser Val Ile Ile Met Ala Tyr Thr Thr Glu
        195                 200                 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ala Leu Ala Arg Ile Gln Arg Gly Leu Arg Phe Val Lys Arg Thr
965 970 975

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Gly Ala Leu Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Leu Glu Glu Arg Lys
1220 1225 1230

Thr Ile Lys Val Leu Leu Glu Tyr Ala Asp Lys Met Phe Thr Tyr
1235 1240 1245

Val Phe Val Leu Glu Met Leu Leu Lys Trp Val Ala Tyr Gly Phe
1250 1255 1260

Lys Lys Tyr Phe Thr Asn Ala Trp Cys Trp Leu Asp Phe Leu Ile
1265 1270 1275

Val Asp Val Ser Leu Val Ser Leu Val Ala Asn Thr Leu Gly Phe
1280 1285 1290

Ala Glu Met Gly Pro Ile Lys Ser Leu Arg Thr Leu Arg Ala Leu
1295 1300 1305

Arg Pro Leu Arg Ala Leu Ser Arg Phe Glu Gly Met Arg Val Val
1310 1315 1320

Val Asn Ala Leu Val Gly Ala Ile Pro Ser Ile Met Asn Val Leu
1325 1330 1335

Leu Val Cys Leu Ile Phe Trp Leu Ile Phe Ser Ile Met Gly Val
1340 1345 1350

Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe Gly Arg Cys Ile Asn Gln Thr Glu
1355 1360 1365

Gly Asp Leu Pro Leu Asn Tyr Thr Ile Val Asn Asn Lys Ser Gln
1370 1375 1380

Cys Glu Ser Leu Asn Leu Thr Gly Glu Leu Tyr Trp Thr Lys Val
1385 1390 1395

Lys Val Asn Phe Asp Asn Val Gly Ala Gly Tyr Leu Ala Leu Leu
1400 1405 1410

Gln Val Ala Thr Phe Lys Gly Trp Met Asp Ile Met Tyr Ala Ala
1415 1420 1425

Val Asp Ser Arg Gly Tyr Glu Glu Gln Pro Gln Trp Glu Tyr Asn
1430 1435 1440

Leu Tyr Met Tyr Ile Tyr Phe Val Ile Phe Ile Ile Phe Gly Ser
1445 1450 1455

Phe Phe Thr Leu Asn Leu Phe Ile Gly Val Ile Ile Asp Asn Phe
1460 1465 1470

Asn Gln Gln Lys Lys Lys Leu Gly Gly Gln Asp Ile Phe Met Thr
1475 1480 1485

Glu Glu Gln Lys Lys Tyr Tyr Asn Ala Met Lys Lys Leu Gly Ser
1490 1495 1500

Lys Lys Pro Gln Lys Pro Ile Pro Arg Pro Leu Asn Lys Tyr Gln
1505 1510 1515

Gly Phe Ile Phe Asp Ile Val Thr Lys Gln Ala Phe Asp Val Thr
1520 1525 1530

Ile Met Phe Leu Ile Cys Leu Asn Met Val Thr Met Met Val Glu
1535 1540 1545

Thr Asp Asp Gln Ser Pro Glu Lys Ile Asn Ile Leu Ala Lys Ile
1550 1555 1560

Asn Leu Leu Phe Val Ala Ile Phe Thr Gly Glu Cys Ile Val Lys
1565 1570 1575

Leu Ala Ala Leu Arg His Tyr Tyr Phe Thr Asn Ser Trp Asn Ile
1580 1585 1590

Phe Asp Phe Val Val Val Ile Leu Ser Ile Val Gly Thr Val Leu
1595 1600 1605

Ser Asp Ile Ile Gln Lys Tyr Phe Phe Ser Pro Thr Leu Phe Arg
1610 1615 1620

Val Ile Arg Leu Ala Arg Ile Gly Arg Ile Leu Arg Leu Ile Arg
1625 1630 1635

Gly Ala Lys Gly Ile Arg Thr Leu Leu Phe Ala Leu Met Met Ser
1640 1645 1650

Leu Pro Ala Leu Phe Asn Ile Gly Leu Leu Leu Phe Leu Val Met
1655 1660 1665

Phe Ile Tyr Ser Ile Phe Gly Met Ala Asn Phe Ala Tyr Val Lys
1670 1675 1680

Trp Glu Ala Gly Ile Asp Asp Met Phe Asn Phe Gln Thr Phe Ala
1685 1690 1695

Asn Ser Met Leu Cys Leu Phe Gln Ile Thr Thr Ser Ala Gly Trp
1700 1705 1710

Asp Gly Leu Leu Ser Pro Ile Leu Asn Thr Gly Pro Pro Tyr Cys
1715 1720 1725

Asp Pro Thr Leu Pro Asn Ser Asn Gly Ser Arg Gly Asp Cys Gly
1730 1735 1740

Ser Pro Ala Val Gly Ile Leu Phe Phe Thr Thr Tyr Ile Ile Ile
1745 1750 1755

Ser Phe Leu Ile Val Val Asn Met Tyr Ile Ala Ile Ile Leu Glu
1760 1765 1770

Asn Phe Ser Val Ala Thr Glu Glu Ser Thr Glu Pro Leu Ser Glu
1775 1780 1785

Asp Asp Phe Asp Met Phe Tyr Glu Ile Trp Glu Lys Phe Asp Pro
1790 1795 1800

Glu Ala Thr Gln Phe Ile Glu Tyr Ser Val Leu Ser Asp Phe Ala
1805 1810 1815

Asp Ala Leu Ser Glu Pro Leu Arg Ile Ala Lys Pro Asn Gln Ile
1820 1825 1830

Ser Leu Ile Asn Met Asp Leu Pro Met Val Ser Gly Asp Arg Ile
1835 1840 1845

His Cys Met Asp Ile Leu Phe Ala Phe Thr Lys Arg Val Leu Gly
1850 1855 1860

Glu Ser Gly Glu Met Asp Ala Leu Lys Ile Gln Met Glu Glu Lys
1865 1870 1875

Phe Met Ala Ala Asn Pro Ser Lys Ile Ser Tyr Glu Pro Ile Thr
1880 1885 1890

Thr Thr Leu Arg Arg Lys His Glu Glu Val Ser Ala Met Val Ile
1895 1900 1905

Gln Arg Ala Phe Arg Arg His Leu Leu Gln Arg Ser Leu Lys His
1910 1915 1920

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

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

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

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

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

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

Ser Ile Val
2015

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

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

<400> 5
accgtagcta cgtacgtata tagaaagggc gcgatcgtcg tcgcgtatga cgacttagca 60

tgc 63

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

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

<400> 6
accggtagct acgtacgtta tttagaaagg ggtgtgtgtg tgtgtgtaaa ccggggtttt 60

cgggatcgtc cgtcgcgtat gacgacttag ccatgcacgg tatatcgtat taggactagc 120

gattgactag 130

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/008381 A3

(51) International Patent Classification⁷: C12Q 1/68, C07K 14/47, 16/18, C12N 15/85, 5/10, A01K 67/027, G01N 33/50

(21) International Application Number: PCT/US01/22639

(22) International Filing Date: 19 July 2001 (19.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/219,738 20 July 2000 (20.07.2000) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION [US/US]; 615 Arapeen Drive, Suite 110, Salt Lake City, UT 84108 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): KEATING, Mark, T. [US/US]; 1 Mason Street, Brookline, MA 02446 (US). SPLAWSKI, Igor [PL/US]; 36 Queensberry Street, Apt. 7, Boston, MA 02215 (US).

(74) Agents: SAXE, Stephen, A. et al.; Rothwell, Figg, Ernst & Manbeck, P.C., Suite 800, 1425 K Street, N.W., Washington, D.C. 20005 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*

(88) Date of publication of the international search report:
7 August 2003

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

WO 02/008381 A3

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

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

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/22639

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/85 C12N5/10
A01K67/027 G01N33/50

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)
IPC 7 C12Q C07K C12N A01K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ROOK M B ET AL.: "Human SCN5A gene mutations alter cardiac sodium channel kinetics and are associated with the Brugada syndrome" CARDIOVASCULAR RESEARCH, vol. 44, 1999, pages 507-517, XP002227968 cited in the application * see especially page 508, col.2 - page 509, col.1; as well as Fig.'s 3,4 * the whole document --- -/--	1-8,19, 21-25, 27,28

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in 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 document but published on or after the international filing date

'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (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	Date of mailing of the international search report
21 January 2003	06/02/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Knehr, M

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ial Application No
PCT/US 01/22639

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

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

-/--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/22639

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	SPLAWSKI I ET AL.: "Variant of SCN5A sodium channel implicated in risk of cardiac arrhythmia" SCIENCE, vol. 297, - 23 August 2002 (2002-08-23) pages 1333-1336, XP002227971 the whole document	19-28

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.
PCT/US 01/22639

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 6, 7, and 10-14 are directed to diagnostic methods practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the polymorphism as specified within SEQ ID NO:4.

2. [X] Claims Nos.: 29-31
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international Search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

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

International Application No. PCT/US 01 22639

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 29-31

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

Likewise, claim 9 relates to an antibody defined by a result to be achieved, namely its property to bind to a polypeptide according to SEQ ID NO:4 AND NOT to the corresponding wild-type amino acid sequence. Without disclosure or support of any specific region or epitope suggesting specificity in binding as a presupposition for such a distinction, again there is no support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for any of such antibodies.
The same refers to claims 10-13 referring to a method for diagnosing predisposition of drug-induced torsade de pointes or ventricular fibrillation by using such an antibody. The search of claims 9-13 has therefore been limited to antibodies and methods using them within the context of the S1103C polymorphism of the SCN5A protein.

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int al Application No
PCT/US 01/22639

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

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/19		４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/21		４Ｈ０４５
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｐ 21/08		
Ｃ１２Ｐ 21/08	Ｃ１２Ｑ 1/02		
Ｃ１２Ｑ 1/02	Ｃ１２Ｑ 1/68	Ａ	
Ｃ１２Ｑ 1/68	Ｇ０１Ｎ 27/00	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 27/00	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 27/447	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｍ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/566		
Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
	Ｇ０１Ｎ 27/26	３１５Ｅ	

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

(72)発明者 マーク・ティ・キーティング
アメリカ合衆国０２４４６マサチューセッツ州ブルックライン、メイソン・ストリート１番
(72)発明者 イゴール・スプラフスキー
アメリカ合衆国０２２１５マサチューセッツ州ボストン、アパートメント７、クイーンズベリー・ストリート３６番

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

专利名称(译)	SCN5A的常见多态性与药物诱发的心律失常有关		
公开(公告)号	JP2004504054A	公开(公告)日	2004-02-12
申请号	JP2002513866	申请日	2001-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	犹他大学研究基金会		
申请(专利权)人(译)	犹他州研究基金会大学		
[标]发明人	マークティキーティング イゴールスプラフスキー		
发明人	マーク·ティ·キーティング イゴール·スプラフスキー		
IPC分类号	A01K67/027 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/02 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N27/00 G01N27/447 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/705 A01K2217/05 C07K14/47 C12Q1/6883 C12Q2600/156		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N27/00.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A G01N27/26.315.E		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BA14 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB07 2G045/CB11 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/GC20 2G060/AA07 2G060/AC10 2G060/AE17 2G060/AF20 2G060/FA01 2G060/HA02 2G060/HC07 2G060/HC10 2G060/HC18 2G060/HD03 2G060/KA06 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA80 4B024/CA03 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA12 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ13 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QQ68 4B063/QQ79 4B063/QR14 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR41 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR80 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS38 4B063/QX04 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA19X 4B065/AA26X 4B065/AA41X 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74		
代理人(译)	矢野正树		
优先权	60/219738 2000-07-20 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及在SCN5A特定突变引起德Powantsu的尖端扭转或心室纤维性颤动的药物诱导。具有突变的个体，当给予某些药物，很容易扭转性室速Powantsu的发作或心室颤动药物引起的。这种偏爱可能由本发明通过分析个体SCN5A的DNA序列进行诊断。通过筛选的个体中进行的突变可能避免扭转性室速Powantsu或室颤药物引起的。此外，可以测试药物以确定它是否引起Torsades de Points或心室颤动。

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