

(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2007-537712

(P2007-537712A)

(43) 公表日 平成19年12月27日(2007.12.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 ZNAA	4B024
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 M	
GO1N 33/566 (2006.01)	GO1N 33/566	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2006-534540 (P2006-534540)	(71) 出願人	502386053 バイオノミックス リミテッド オーストラリア, サウス オーストラリア 5031, セバルトン, ダルグレイ イッシュ ストリート 31
(86) (22) 出願日	平成16年10月13日 (2004.10.13)	(74) 代理人	100103816 弁理士 風早 信昭
(85) 翻訳文提出日	平成18年5月31日 (2006.5.31)	(74) 代理人	100120927 弁理士 浅野 典子
(86) 国際出願番号	PCT/AU2004/001399	(72) 発明者	シェッフアー, イングリッド, アイリ ーン オーストラリア, ヴィクトリア 312 3, ハウソーン イースト, リウラ グローヴ 3
(87) 国際公開番号	W02005/035784		
(87) 国際公開日	平成17年4月21日 (2005.4.21)		
(31) 優先権主張番号	2003905565		
(32) 優先日	平成15年10月13日 (2003.10.13)		
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新生児てんかん症候群または乳児てんかん症候群についての診断方法

## (57) 【要約】

患者において新生児てんかん症候群または乳児てんかん症候群をBFNISとして診断するための方法であって、患者のサンプルにおいて、遺伝子の調節領域を含めてSCN2A遺伝子の変化の存在について検査すること、および、SCN2Aの変化が検出される際には、BFNISの可能性が高いことを示す診断を確立すること、または、SCN2Aの変化が検出されないときには、BFNISの可能性が低いことを示す診断を確立することを含む方法。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

発作の発症が生後 1 年以内である患者において新生児てんかん症候群または乳児てんかん症候群を B F N I S として診断するための方法であって、患者のサンプルにおいて、遺伝子の調節領域を含めて S C N 2 A 遺伝子の変化における存在について検査すること、および、S C N 2 A の変化が検出されるときには、B F N I S の可能性が高いことを示す診断を確立すること、または、S C N 2 A の変化が検出されないときには、B F N I S の可能性が低いことを示す診断を確立することを含む方法。

## 【請求項 2】

S C N 2 A の変化が B F N I S に関連していることが既知である場合には、B F N I S の可能性が非常に高いことを示す診断を確立する請求項 1 に記載の方法。 10

## 【請求項 3】

S C N 2 A の変化が患者の罹患した親または親族に存在する場合には、B F N I S の可能性が非常に高いことを示す診断を確立する請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

S C N 2 A の変化がミスセンス変異である場合には、B F N I S の可能性が非常に高いことを示す診断を確立する請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

S C N 2 A の変化の存在について検査し、かつ、その変化の種類を特定するために 1 つまたは複数のアッセイを行うことを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

## 【請求項 6】

以下の工程を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法：

( 1 ) 患者の S C N 2 A 遺伝子における変化の存在について検査するために 1 つまたは複数のアッセイを行う工程；および、その結果が S C N 2 A 遺伝子における変化の存在を示すならば、

( 2 ) S C N 2 A の変化の種類を特定するために 1 つまたは複数のアッセイを行う工程。

## 【請求項 7】

患者のサンプルにおいて、遺伝子の調節領域を含めて K C N Q 2 遺伝子および / または K C N Q 3 遺伝子における変化の存在について検査すること、および、K C N Q 2 または K C N Q 3 の変化が検出されるときには、B F N I S の可能性が高いことを示す診断を確立すること、または、K C N Q 2 または K C N Q 3 の変化が検出されないときには、B F I S の可能性を示す診断を確立することをさらに含む請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

## 【請求項 8】

発作の発症が生後 1 年以内である患者において、新生児てんかん症候群または乳児てんかん症候群を、B F N I S、B F N S または B F I S のいずれかとして診断するための方法であって、以下の工程を含む方法：

( 1 ) ( a ) 患者のサンプルにおいて、遺伝子の調節領域における変化を含めて S C N 2 A 遺伝子における変化の存在について検査すること；および / または

( b ) 患者のサンプルにおいて、遺伝子の調節領域における変化を含めて K C N Q 2 遺伝子および / または K C N Q 3 遺伝子における変化の存在について検査すること；および 40

( 2 ) ( a ) S C N 2 A の変化が検出されるときには、B F N I S の可能性が高いことを示す診断を確立すること；

( b ) K C N Q 2 または K C N Q 3 の変化が検出されるときには、B F N S の可能性が高いことを示す診断を確立すること；または

( c ) S C N 2 A、K C N Q 2 または K C N Q 3 の変化が検出されないときには、B F I S の可能性を示す診断を確立すること。

## 【請求項 9】

S C N 2 A、K C N Q 2 および / または K C N Q 3 における変化の存在について検査し、かつ、その変化の種類を特定するために 1 つまたは複数のアッセイを行うことを含む、 50

請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

以下の工程を含む、請求項 8 に記載の方法：

- (1) 患者の S C N 2 A 遺伝子、K C N Q 2 遺伝子および/または K C N Q 3 遺伝子における変化の存在について検査するために 1 つまたは複数のアッセイを行う工程；および、その結果がこれらの遺伝子のいずれか 1 つにおける変化の存在を示すならば、  
 (2) その変化の種類を特定するために 1 つまたは複数のアッセイを行う工程。

【請求項 11】

アッセイの 1 つが D N A ハイブリダイゼーションアッセイである請求項 4 , 5 , 9 または 10 に記載の方法。

10

【請求項 12】

S C N 2 A、K C N Q 2 もしくは K C N Q 3 の遺伝子プローブ、S C N 2 A、K C N Q 2 もしくは K C N Q 3 のエキソン特異的なプローブ、または S C N 2 A、K C N Q 2 もしくは K C N Q 3 の対立遺伝子特異的プローブは前記患者から単離されたゲノム D N A にハイブリダイゼーションされる請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

アッセイの 1 つが高速液体クロマトグラフィーである請求項 4 , 5 , 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 14】

アッセイの 1 つが電気泳動アッセイである請求項 4 , 5 , 9 または 10 に記載の方法。

20

【請求項 15】

検査されるサンプル D N A を、S C N 2 A 遺伝子、K C N Q 2 遺伝子または K C N Q 3 遺伝子の少なくとも 1 つのエキソンについて増幅フラグメントを作製するために、定量的に増幅し、そしてそれぞれの増幅されたエキソンについて増幅生成物の長さを、野生型 S C N 2 A 遺伝子、野生型 K C N Q 2 遺伝子または野生型 K C N Q 3 遺伝子が同じプライマーを使用して増幅されるときに得られる増幅生成物の長さと比較し、それにより、増幅されたサンプルのエキソンと、対応する増幅された野生型エキソンとの間の長さの違いにより、サンプルの S C N 2 A 遺伝子、K C N Q 2 遺伝子または K C N Q 3 遺伝子における短縮化変化の存在が反映される、請求項 4 , 5 , 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 16】

アッセイの 1 つが S C N 2 A、K C N Q 2 または K C N Q 3 の対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを使用する D N A 増幅を含む請求項 4 , 5 , 9 または 10 に記載の方法。

30

【請求項 17】

アッセイの 1 つが S S C P 分析である請求項 4 , 5 , 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 18】

アッセイの 1 つが R N a s e 保護である請求項 4 , 5 , 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 19】

アッセイの 1 つが D G G E である請求項 4 , 5 , 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 20】

アッセイの 1 つが酵素アッセイである請求項 4 , 5 , 9 または 10 に記載の方法。

40

【請求項 21】

前記アッセイが M u t S の使用を含む請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

アッセイの 1 つが患者の S C N 2 A タンパク質、K C N Q 2 タンパク質または K C N Q 3 タンパク質の電気泳動移動度を調べる請求項 4 , 5 , 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 23】

アッセイの 1 つが免疫アッセイである請求項 4 , 5 , 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 24】

アッセイの 1 つが D N A 配列決定である請求項 4 , 5 , 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 25】

50

以下の工程を含む、SCN2A遺伝子におけるBFNIS関連変異について患者を検査するための方法：

- a) SCN2A遺伝子の少なくとも1つのエキソンを各患者の身体サンプルから定量的に増幅して、増幅フラグメントを作製する工程；
- b) 増幅されたフラグメントの性質を、非変異のSCN2A遺伝子における同じエキソンの増幅によって生じるフラグメントに基づく標準値と比較する工程；および
- c) 対応する非変異のSCN2Aエキソンと比較して患者において異なる性質を有するb)で特定された各エキソンの核酸配列を決定する工程。

【請求項26】

以下の工程を含む、SCN2A遺伝子におけるBFNIS関連変異について患者を検査するための方法：

- a) SCN2A遺伝子の少なくとも1つのエキソンを、それぞれの増幅されたエキソンに隣接するイントロン領域に対して相補的なプライマーを使用して、各患者の身体サンプルから定量的に増幅する工程；
- b) それぞれの増幅されたエキソンについて増幅生成物の長さを、野生型SCN2A遺伝子が、同じプライマーを使用して増幅されるときに得られる増幅生成物の長さと比較し、それにより、増幅されたサンプルのエキソンと、対応する増幅された野生型エキソンとの間の長さの違いにより、サンプルのSCN2A遺伝子における短縮化変異の存在が反映される工程；および

- c) 短縮化変異を含むことがb)において特定されたそれぞれのエキソンの核酸配列を決定する工程。

【請求項27】

以下の工程を含む、SCN2A遺伝子におけるBFNIS関連変異について患者を検査するための方法：

- a) SCN2A遺伝子の少なくとも1つのエキソンを、それぞれの増幅されたエキソンに隣接するイントロン領域に対して相補的なプライマーを使用して、各患者の身体サンプルから定量的に増幅する工程；
- b) a)から得られたフラグメントを、非変異のSCN2A遺伝子における同じエキソンの増幅によって生じたフラグメントとハイブリダイゼーションさせる工程；
- c) 対応する野生型フラグメントにハイブリダイゼーションしないか、または、ミスマッチしたヘテロ二重鎖を形成するかのいずれかであることがb)において特定されたそれぞれの患者エキソンの核酸配列を決定する工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新生児てんかん症候群または乳児てんかん症候群についての診断方法に関連する。

【背景技術】

【0002】

てんかんは、脳障害の多様な集積を構成し、人口のうち約3%に対して、その一生のうちのある時点で影響を与える(Annegers, 1996)。てんかん発作は、中枢神経系のニューロンの集団の神経インパルスの発生の障害によって生じる挙動における突発性的変化として規定することができる。このことは、種々の程度の不随意性の筋収縮、およびしばしば意識の喪失を生じさせる。てんかんの症候群は、特徴的な症状、発作のタイプ、原因、発症年齢、およびEEGパターンに基づいて、40を超える異なるタイプに分類されている(Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1989)。しかし、全ての症候群に対して共通である単一の特徴は、発作(痙攣)として、ときどき、または予測不能、その両方で発現される、ニューロンの興奮性の持続性の増大である。

## 【0003】

罹患した個体の約40%において、てんかんの病因論に対する遺伝的な寄与が存在すると推定されている(Gardiner, 2000)。てんかん発作は、最終的にはニューロンの同調性を損なう、多数の分子的異常(逸脱)のエンドポイントであり得るので、てんかんについての遺伝的基礎は、雑多であり得る。表現型の一部としててんかんを含む200を超えるメンデル(法則)の疾患がある。これらの疾患においては、発作(痙攣)は、脳の構造または機能における妨害のような神経学的関与を裏付ける症状である。対照的に、多数の「純粋な(pure)」てんかん症候群がまた存在し、ここではてんかんは、罹患した個体における唯一の兆候である。これらは、特発性と称されて、全てのてんかん症例の60%より多くを占める。

10

## 【0004】

特発性のてんかんは、さらに部分的に分割されて、サブタイプに一般化されている。部分てんかん(焦点てんかん、または局所てんかん)の発作は、局所的な皮質の放電から生じ、その結果、筋肉の特定の群のみが関与して、意識は保持され得る(Sutton, 1990)。しかし、全身性てんかんでは、EEGの放電は、焦点を示さず、それによって脳の全ての皮質下領域が関与する。全身性てんかんが、頻繁に遺伝されるという観察は理解できるが、遺伝的欠陥(おそらく脳において恒常的に発現される)が、部分的痙攣(発作)を生じる機構は、ほとんど不明である。新生児および乳児においては、おそらく脳の髄鞘形成が不完全であるために、臨床的および神経生物学的観点からの、全身性てんかん

20

## 【0005】

生後1年以内のてんかんは、以前では、主として後天的な周産期因子のためであると考えられていた。しかし、現在では、2つの良性の常染色体優性てんかん症候群が生後1年において広く認められている。1つは良性の家族性新生児発作(痙攣)(BFNS)であり、これは、通常の場合には生後3日目前後で現れ、強直発作または間代発作によって特徴づけられる。これらの発作(痙攣)は生後2~3週間以内に止み、5%の個体が生後において熱性痙攣を有し、11%が生後においててんかんを有する(Plouin, 1994)。研究により、多くの症例におけるこの症候群についての遺伝的基礎がカリウムチャンネル遺伝子のKCNQ2およびKCNQ3における変異のためであることが示されている。

30

## 【0006】

もう1つは良性の家族性乳児発作(痙攣)(BFIS)であり、これは生後4ヶ月~8ヶ月の間で現れ、様々な一群の強直性または間代性の部分性発作または全身性発作を2日間~3日間伴う。発作(痙攣)は、通常の場合には1歳前後までに消失し、しかし、一部の個体ではその後の小児期において発作性ジスキネジーを伴うことがある。BFISの原因となる遺伝子は明確には特定されていないが、第19染色体および第16染色体に対する連鎖が報告されている(Szepietowski他、1997; Guipponi他、1997)。

## 【0007】

1983年において、BFISが認識される以前に、BFNSとBFISとの中間的な変化型を有するアメリカ人の家族が報告され、これは良性の家族性新生児乳児発作(痙攣)(BFNIS)と呼ばれ、この場合、発作(痙攣)の発症が生後2日から3.5ヶ月までと変化していた(KaplanおよびLacey, 1983)。最近では、2つのBFNIS家族の遺伝子分析により、SCN2A遺伝子においてこの障害に関係していた2つの変異が特定されている(Heron他、2002)。

40

## 【0008】

本発明者らは、BFNISが推定されるか、またはBFNISの可能性のあるさらなる家族からの罹患した個体の分析によって本研究をまとめ上げている。これにより、6家族において、進化的に保存されたアミノ酸の変化を生じさせるSCN2Aでのさらなるミスセンス変異が特定された。BFNISが推定されると臨床的に認められた家族、および、

50

B F N I S の可能性があると認められた 9 家族中 4 家族の両方が S C N 2 A の変異を含んでいた。このことから、新生児期および乳児期早期のてんかんにおける遺伝的要因の重要性がさらに強調される。他の形態の小児てんかんが検査された 9 5 家族のうち、1 つも S C N 2 A における変異を含んでいなかった。

【 0 0 0 9 】

本発明者らは、罹患した患者における S C N 2 A 遺伝子、ならびに、必要に応じて、K C N Q 2 遺伝子および / または K C N Q 3 遺伝子における変化の存在について調べることに基づいて、B F N I S ならびに他の新生児てんかんおよび乳児てんかんを診断するための方法を確立している。新生児てんかんおよび乳児てんかんの診断を助けるための分子的診断検査法の開発は重要である。そのような検査法により、罹患した患者の適正な管理が可能になり、また、患者の過剰検査および過剰処置が回避される。

【 発明の開示 】

【 0 0 1 0 】

本発明の 1 つの局面では、発作（痙攣）の発症が生後 1 年以内である患者において新生児てんかん症候群または乳児てんかん症候群を B F N I S として診断するための方法が提供され、この場合、この方法は、患者のサンプルにおいて、遺伝子の調節領域を含めて S C N 2 A 遺伝子における変化の存在について検査すること、および、S C N 2 A の変化が検出されるときには、B F N I S の可能性が高いことを示す診断を確立すること、または、S C N 2 A の変化が検出されないときには、B F N I S の可能性が低いことを示す診断を確立することを含む。

【 0 0 1 1 】

この情報は、患者に対する正しい処置療法を開始するために重要であり、また、この情報により、患者に対する必要のない検査および関連した外傷が回避される。

【 0 0 1 2 】

S C N 2 A 遺伝子における変化の種類には、すべての形態の遺伝子配列変化が包含され得る。これらには、コード領域および非コード領域（例えば、プロモーター、イントロンまたは非翻訳領域など）における欠失、挿入、再配置および点変異が含まれる。しかし、具体的には、ミスセンス変異が B F N I S に関連している。欠失は遺伝子全体または遺伝子の一部のみである場合があり、これに対して、点変異は、停止コドン、フレームシフトまたはアミノ酸置換を生じさせる場合がある。S C N 2 A の調節領域（例えば、プロモーターなど）において生じる点変異は、m R N A の発現の喪失もしくは減少をもたらすか、または、適正な m R N A プロセッシングを無効にすることがあり、これにより、m R N A の安定性または翻訳効率の低下が生じる。

【 0 0 1 3 】

B F N I S と以前から関連していた、または、患者の罹患した親もしくは親族に存在する患者における S C N 2 A の変化を特定することにより、その患者が B F N I S を有する可能性が増大する。その上、発症年齢に関連する情報は、S C N 2 A の変化を特定することができないことによって B F N I S が除外されると、B F I S または B F N S の診断を示唆するために使用することができる。図 1 におけるフローチャートは本発明の 1 つの実施形態を例示する。

【 0 0 1 4 】

本発明の 1 つの実施形態では、患者において新生児てんかん症候群または乳児てんかん症候群を B F N I S として診断するための方法が提供され、この場合、この方法は、S C N 2 A の変化の存在について検査し、かつ、その変化の種類を特定するために 1 つまたは複数のアッセイを行うことを含む。

【 0 0 1 5 】

さらなる実施形態では、下記の工程を含む、患者において新生児てんかん症候群または乳児てんかん症候群を B F N I S として診断するための方法が提供される：

( 1 ) 患者の S C N 2 A 遺伝子における変化の存在について検査するために 1 つまたは複数のアッセイを行う工程；および、その結果が S C N 2 A 遺伝子における変化の存在を示

10

20

30

40

50

すならば、

(2) SCN2Aの変化の種類を特定するために1つまたは複数のアッセイを行う工程。

【0016】

本発明のさらなる局面では、発作(痙攣)の発症が生後1年以内である患者において、新生児てんかん症候群または乳児てんかん症候群を、BFNIS、BFNSまたはBFISのいずれかとして診断するための方法が提供され、この場合、この方法は、

(1)(a)患者のサンプルにおいて、遺伝子の調節領域における変化を含めてSCN2A遺伝子における変化の存在について検査すること；および/または

(b)患者のサンプルにおいて、遺伝子の調節領域における変化を含めてKCNQ2遺伝子および/またはKCNQ3遺伝子における変化の存在について検査すること；および

(2)(a)SCN2Aの変化が検出されるときには、BFNISの可能性が高いことを示す診断を確立すること；

(b)KCNQ2またはKCNQ3の変化が検出されるときには、BFNSの可能性が高いことを示す診断を確立すること；または

(c)SCN2A、KCNQ2またはKCNQ3の変化が検出されないときには、BFISの可能性を示す診断を確立することを含む。

【0017】

図2におけるフローチャートは本発明の1つの実施形態を例示する。様々なサブユニットにおける変化を検出するためのスクリーニングに、例示される順序とは異なる順序で着手することができ、それにもかかわらず、そのようなスクリーニングは最終的には同じ臨床的情報をもたらすことが理解される。例えば、KCNQ2における変化についてのスクリーニングに着手し、陰性ならば、それに続いて、KCNQ3における変化についてのスクリーニングに着手し、陰性ならば、それに続いて、SCN2Aにおける変化についてのスクリーニングに着手することができる。家族歴を伴う臨床的観察結果および臨床的観察結果は、スクリーニングの順序を決定する際に用いることができ、また、診断に達する際にも、特に、陰性の遺伝子検査の後でBFISの診断に達する際にも用いることができる。

【0018】

KCNQ2遺伝子およびKCNQ3遺伝子における変化の種類には、SCN2A遺伝子について上記で記載されたようにすべての形態の遺伝子配列変化が包含され得る。

【0019】

本発明のさらなる実施形態では、患者において、新生児てんかん症候群または乳児てんかん症候群を、BFNIS、BFNSまたはBFISとして診断するための方法が提供され、この場合、この方法は、SCN2A、KCNQ2またはKCNQ3における変化の存在について検査し、かつ、その変化の種類を特定するために1つまたは複数のアッセイを行うことを含む。

【0020】

さらなる実施形態では、下記の工程を含む、患者において、新生児てんかん症候群または乳児てんかん症候群を、BFNIS、BFNSまたはBFISとして診断するための方法が提供される：

(1)患者のSCN2A遺伝子、KCNQ2遺伝子またはKCNQ3遺伝子における変化の存在について検査するために1つまたは複数のアッセイを行う工程；および、その結果がこれらの遺伝子のいずれか1つにおける変化の存在を示すならば、

(2)その変化の種類を特定するために1つまたは複数のアッセイを行う工程。

【0021】

数多くのアッセイシステムを、SCN2A、KCNQ2またはKCNQ3の変化の存在について検査するために使用することができ、従って、本発明は、下記に示される例によって限定されない。

【0022】

10

20

30

40

50

1つの実施形態において、用いられるアッセイシステムは、SCN2A、KCNQ2またはKCNQ3の野生型DNAに対する比較での、患者サンプルに由来するSCN2A、KCNQ2またはKCNQ3のDNAの分析であり得る。ゲノムDNAは診断分析のために使用され、身体の細胞（例えば、血液またはほおに存在する細胞など）、組織生検物、手術試料または検死材料（これらに限定されない）をはじめとする数多くの供給源から得ることができる。DNAを単離し、診断アッセイのためにそのまま使用することができ、または、分析に先立ってポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅することができる。同様に、RNAまたはcDNAもまた、PCR増幅を伴って、またはPCR増幅を伴うことなく使用することができる。加えて、出生前診断を、胎児細胞、胎盤細胞または羊水を検査することによって達成することができる。

10

**【0023】**

特定の実施形態では、DNAハイブリダイゼーションアッセイを用いることができる。これらは、SCN2A遺伝子、KCNQ2遺伝子またはKCNQ3遺伝子について特異的なプローブ型アッセイからなり得る。1つのそのようなアッセイでは、1つまたは複数の制限酵素で消化されているDNAの一連のサブロットを調べることができる。各ロットは一連の正常な個体および一連の患者のサンプルを含むことができる。SCN2A遺伝子、KCNQ2遺伝子またはKCNQ3遺伝子の近傍の配列、あるいは、SCN2A遺伝子、KCNQ2遺伝子またはKCNQ3遺伝子を含む配列（SCN2A、KCNQ2またはKCNQ3の遺伝子プローブ）でプローブされたとき、正常なDNAとは長さが異なるハイブリダイゼーションフラグメントを示すサンプルにより、起こり得るSCN2A、KCNQ2またはKCNQ3の変化が示される。非常に大きい制限フラグメントを生じさせる制限酵素が使用されるならば、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を用いることができる。

20

**【0024】**

SCN2A、KCNQ2またはKCNQ3のエキソン特異的なハイブリダイゼーションアッセイもまた用いることができる。このタイプのプローブに基づくアッセイでは、SCN2A遺伝子、KCNQ2遺伝子またはKCNQ3遺伝子のエキソンにその野生型形態で特異的かつ選択的にハイブリダイゼーションする少なくとも1つのプローブが利用される。従って、核酸プローブを含有する二重鎖核酸ハイブリッドの形成がないことにより、関連した遺伝子における変化の存在が示される。プローブに基づく検査の高い特異性のために、何らかの陰性の結果は、変化の存在を非常に示している。しかし、さらなる究明アッセイを用いて、変化の種類を特定し、それが疾患関連であるという可能性を明らかにしなければならない。

30

**【0025】**

エキソン特異的アッセイ法はまた、BFNISまたはBFNSに関係する以前に決定されたSCN2A、KCNQ2またはKCNQ3の変化を特定するために適合することができる。この局面では、SCN2A遺伝子、KCNQ2遺伝子またはKCNQ3遺伝子のいずれか1つとその変化した形態で特異的かつ選択的にハイブリダイゼーションするプローブが使用される（対立遺伝子特異的プローブ）。この場合、核酸プローブを含有する二重鎖核酸ハイブリッドの形成により、関連した遺伝子における変化の存在が示される。エキソン特異的アッセイ法のそれぞれの変法において、疾患に関連しない遺伝子における既知の多型を考慮に入れることは重要である。二次アッセイ（例えば、DNA配列決定など）を用いて、何らかの疑われる変化が既知の多型でないことを確実にしなければならない。

40

**【0026】**

上記アッセイのそれぞれのために使用されるエキソン特異的プローブは下記に由来し得る：（1）各エキソンに隣接するイントロン特異的プライマーを使用する、SCN2A遺伝子、KCNQ2遺伝子またはKCNQ3遺伝子の各エキソンのPCR増幅；（2）各エキソンについて特異的なcDNAプローブ；または（3）SCN2A、KCNQ2またはKCNQ3のエキソンをまとめて表す一連のオリゴヌクレオチド。

**【0027】**

50

さらなる実施形態において、ヘテロ二重鎖の形成を分析するためのアッセイを用いることができる。S C N 2 A、K C N Q 2 または K C N Q 3 の変性させた野生型 D N A を患者由来の D N A サンプルと混合することによって、検査中の関連した遺伝子における 2 つのサンプルの間に配列変化があれば、ヘテロ二重鎖およびホモ二重鎖の混合集団の形成が D N A の再アニーリングのときにもたらされる。この混合集団の分析を、部分的変性温度のもとで行われる高速液体クロマトグラフィー ( H P L C ) のような技術の使用によって達成することができる。この様式では、ヘテロ二重鎖が、その低下した融解温度のために、ホモ二重鎖よりも速く H P L C カラムから溶出する。

#### 【 0 0 2 8 】

さらなる実施形態において、患者のサンプルを電気泳動に基づくアッセイに供することができる。例えば、S C N 2 A、K C N Q 2 または K C N Q 3 のフラグメント長さの違いを明らかにする電気泳動アッセイを用いることができる。各患者のゲノム D N A のフラグメントが、研究中の関連した遺伝子に対するイントロン特異的プライマーにより増幅される。従って、遺伝子の増幅された領域は、目的とするエキソン、エキソン/イントロン境界におけるスプライス部位接合部、および、増幅生成物のいずれかの末端におけるイントロンの短い部分を含む。増幅生成物は電気泳動サイズ分離ゲルで泳動することができ、増幅されたフラグメントの長さは、挿入変異または欠失変異が患者のサンプルに見出されるかどうかを明らかにするために、野生型遺伝子に由来する既知および予想される標準長さフラグメントと比較される。この手法は、好都合には、「多重化」形式で使用することができ、この場合、多数のエキソン ( 一般には 2 個 ~ 8 個 ) に対するプライマーが同時に増幅され、1 枚の電気泳動ゲルで同時に評価される。これは、遺伝子の各エキソンについてプライマーを注意深く選択することによって可能になる。各エキソンにまたがる増幅されたフラグメントは、サイズが異なるように、従って、電気泳動/サイズ分離ゲルで識別可能であるように設計される。この技術の使用により、ヘテロ接合の個体において正常な対立遺伝子および変異型対立遺伝子の両方を検出するという利点を有する。さらに、多重化の使用によって、この技術の使用は非常にコスト効果的であり得る。

#### 【 0 0 2 9 】

さらなる方法において、B F N I S または B F N S に関係する以前に特定された S C N 2 A、K C N Q 2 または K C N Q 3 の変化を検出するための診断的電気泳動アッセイでは、遺伝子の変化したエキソンに特異的に結合する P C R プライマーを利用することができる。この場合、プライマーのハイブリダイゼーションが生じたならば、生成物が電気泳動ゲルにおいて観測されるだけである。従って、増幅生成物の出現は、変化の存在を示すものであり、一方、増幅生成物の長さは、さらなる変化が存在することを示し得る。

#### 【 0 0 3 0 】

さらなる電気泳動アッセイを用いることができる。これらには、一本鎖高次構造多型 ( S S C P ) 法 ( O r i t a 他、1989 ) が含まれ得る。上記で述べたように、各患者のゲノム D N A のフラグメントが、遺伝子の個々のエキソンが増幅され、個々に分析され得るように、S C N 2 A 遺伝子、K C N Q 2 遺伝子または K C N Q 3 遺伝子のいずれか 1 つに対するイントロン特異的プライマーにより P C R 増幅される。エキソン特異的な P C R 生成物は、その後、D N A フラグメントが、その配列組成により決定されるような立体配座に基づいてゲル中を移動するように、非変性ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動に供される。野生型配列と配列が異なるエキソン特異的フラグメントは、異なる二次構造の立体配座を有しており、従って、ゲル中を他とは異なって移動する。患者のサンプルにおける異常に移動する P C R 生成物は、エキソンにおける変化を示しており、二次アッセイ ( 例えば、D N A 配列決定など ) でさらに分析して、変化の種類を特定しなければならない。

#### 【 0 0 3 1 】

用いることができるさらなる電気泳動アッセイには、R N a s e 保護アッセイ ( F i n k e l s t e i n 他、1990 ; K i n s z l e r 他、1991 ) および変性勾配ゲル電気泳動 ( D G G E ) ( W a r t e l l 他、1990 ; S h e f f i e l d 他、1989 )

が含まれる。RNase保護では、変異ポリヌクレオチドを2つ以上のより小さいフラグメントに切断することを含み、これに対して、DGGEでは、変性勾配ゲルを使用して、野生型配列と比較した、変異配列の移動速度の差を検出する。

#### 【0032】

RNase保護アッセイにおいて、ヒト野生型のSCN2A遺伝子、KCNQ2遺伝子またはKCNQ3遺伝子のコード配列に対して相補的である標識リボプローブは、患者から単離されたmRNAまたはDNAのいずれかとハイブリダイゼーションされ、続いて、二重鎖RNA構造におけるいくつかのミスマッチを検出することができる酵素RNase Aにより消化される。ミスマッチがRNase Aによって検出されるならば、RNase Aはそのミスマッチの部位において切断する。従って、アニーリングされたRNA調製物が電気泳動ゲルマトリックスで分離されるとき、ミスマッチがRNase Aによって検出され、切断されたならば、リボプローブおよびmRNAまたはDNAについて全長の二重鎖RNAよりも小さいRNA生成物が認められるであろう。リボプローブは研究中のmRNAまたは遺伝子の全長である必要はなく、そのどちらかのセグメントであり得る。リボプローブがmRNAまたは遺伝子のセグメントのみを含むならば、数多くのこれらのプローブを使用して、mRNA配列全体をミスマッチについてスクリーニングすることが望ましい。

10

#### 【0033】

さらなる実施形態では、酵素に基づくアッセイ(TaylorおよびDeeble、1999)を診断適用において使用することができる。そのようなアッセイでは、S1ヌクレアーゼ、リボヌクレアーゼ、T4エンドヌクレアーゼVII、MutS(Modrich、1991)、CleavaseおよびMutYの使用が含まれる。MutSアッセイでは、タンパク質が、変異配列と野生型配列との間でのヘテロ二重鎖においてヌクレオチドミスマッチを含有する配列に対してのみ結合する。

20

#### 【0034】

アッセイが、SCN2Aタンパク質、KCNQ2タンパク質またはKCNQ3タンパク質に基づくことになる場合、様々な方法が可能である。例えば、診断を、野生型のSCN2Aタンパク質、KCNQ2タンパク質またはKCNQ3タンパク質、および、患者のサンプルから単離されたSCN2Aタンパク質、KCNQ2タンパク質またはKCNQ3タンパク質の電気泳動移動度における違いをモニターすることによって達成することができる。そのような方法は、電荷置換が存在する変化を特定することにおいて、または、挿入、欠失もしくは置換が、生じたタンパク質の電気泳動移動における著しい変化をもたらしている変化を特定することにおいて特に有用である。あるいは、診断は、正常なタンパク質および変化したタンパク質のタンパク質分解的切断パターンにおける違い、または様々なアミノ酸残基のモル比における違いに基づくことができ、あるいは、遺伝子産物の変化した機能を明らかにする機能的アッセイによって行うことができる。

30

#### 【0035】

SCN2Aタンパク質、KCNQ2タンパク質またはKCNQ3タンパク質に基づくさらなるアッセイには免疫アッセイが含まれる。特定の遺伝子産物に対する抗体を惹起させるための様々な手法が、文献に、例えば、米国特許第4172124号および同第4474893号(これらは参考として本明細書中に組み込まれる)に詳しく記載されている。共通する変異部位から離れている遺伝子産物の様々な部分に結合し、その結果、同じ抗体が変異タンパク質および正常なタンパク質の両方に結合するような抗体が、通常の場合には惹起される。本発明において使用される好ましい抗体は、その改善された予測性および特異性のためにモノクローナル抗体である。しかし、所望する高レベルの特異性を有する本質的には任意の抗体を使用することができること、および、高い感度を達成するための最適化が必要とされないことが理解されるであろう。

40

#### 【0036】

BFNIS、BFNSおよびBFISをはじめとする新生児てんかんまたは乳児てんかんに関与することが以前に特定されたSCN2A、KCNQ2またはKCNQ3の変化の

50

診断的検出のためには、欠陥のある遺伝子産物に対して惹起された抗体が好ましい。抗体が、免疫学的反応が生じ得る条件のもとで患者のサンプルの一部に加えられ、その後、サンプルは、そのような反応が生じているかどうかを見るために評価される。この評価を行うための特定の方法は重要ではなく、そのような方法には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、これは米国特許第4016043号（これは参考として本明細書中に組み込まれる）に記載される；蛍光酵素免疫アッセイ（FEIAまたはELFA）、これは、蛍光を発する酵素基質（例えば、4-メチルウンベリフェリル- -ガラクトシドなど）が発色性基質の代わりに使用されることを除いて、ELISAに類似する；および放射免疫アッセイ（RIA）が含まれる。

#### 【0037】

用いることができる最も確定的な診断アッセイはDNA配列決定であり、究極的には、行われることが必要とされる唯一のアッセイであり得る。SCN2A、KCNQ2またはKCNQ3のDNAの野生型配列を、検査患者のSCN2A、KCNQ2またはKCNQ3の配列と比較することにより、高い特異性および高い感度の両方がもたらされる。用いられる一般的な方法論では、目的とするDNAフラグメントを患者DNAから（例えば、PCRを用いて）増幅すること；増幅されたDNAを、増幅プライマーと同じまたは異なり得る配列決定用プライマーと混ぜること；通常のヌクレオチド（A、C、GおよびT）と、取り込まれると、プライマーのさらなる伸長を妨げる鎖停止用ヌクレオチド（例えば、ジデオキシヌクレオチドなど）との存在下で配列決定用プライマーを伸長させること；および、得られた伸長フラグメントの長さについて生成物を分析することが伴う。そのような方法は、Sanger他（1977）によって開示された最初のジデオキシ配列決定法に基づいており、本発明において有用であるが、最終アッセイはそのような方法に限定されない。例えば、目的とする遺伝子の配列またはその一部分を決定するための他の方法もまた用いることができる。代替の方法には、MaxamおよびGilbert（1977）によって記載される方法、ならびに、ジデオキシ法の変法、および鎖停止用ヌクレオチドに全く依らない方法（例えば、米国特許第4971903号（これは参考として本明細書中に組み込まれる））が開示される方法などが含まれる。野生型の配列と比較されたとき、検査患者のエキソンにおける（良性の多型とは異なる）何らかの配列の違いにより、疾患を引き起こす潜在的な変化が示される。

#### 【0038】

本発明の特定の実施形態では、下記の工程を含む、SCN2A遺伝子におけるBFNIS関連変異について患者を検査するための方法が提供される：

- a) SCN2A遺伝子の少なくとも1つのエキソンを各患者の身体サンプルから定量的に増幅して、増幅フラグメントを作製する工程；
- b) 増幅されたフラグメントの性質を、非変異のSCN2A遺伝子における同じエキソンの増幅によって生じるフラグメントに基づく標準値と比較する工程；および
- c) 対応する非変異のSCN2Aエキソンと比較して患者において異なる性質を有することがb)で特定された各エキソンの核酸配列を決定する工程。

#### 【0039】

さらなる特定の実施形態では、下記の工程を含む、SCN2A遺伝子におけるBFNIS関連変異について患者を検査するための方法が提供される：

- a) SCN2A遺伝子の少なくとも1つのエキソンを、それぞれの増幅されたエキソンに隣接するイントロン領域に対して相補的なプライマーを使用して、各患者の身体サンプルから定量的に増幅する工程；
- b) それぞれの増幅されたエキソンについて増幅生成物の長さを、野生型SCN2A遺伝子が、同じプライマーを使用して増幅されるときに得られる増幅生成物の長さと比較し、それにより、増幅されたサンプルのエキソンと、対応する増幅された野生型エキソンとの間の長さの違いにより、サンプルのSCN2A遺伝子における短縮化変異の存在が反映される工程；および
- c) 短縮化変異を含むことがb)において特定されたそれぞれのエキソンの核酸配列を決

10

20

30

40

50

定する工程。

【0040】

さらにさらなる特定の実施形態では、下記の工程を含む、SCN2A遺伝子におけるBFNIS関連変異について患者を検査するための方法が提供される：

a) SCN2A遺伝子の少なくとも1つのエキソンを、それぞれの増幅されたエキソンに隣接するイントロン領域に対して相補的なプライマーを使用して、各患者の身体サンプルから定量的に増幅する工程；

b) a) から得られたフラグメントを、非変異のSCN2A遺伝子における同じエキソンの増幅によって生じたフラグメントとハイブリダイゼーションさせる工程；

c) 対応する野生型フラグメントにハイブリダイゼーションしないか、または、ミスマッチしたヘテロ二重鎖を形成するかのいずれかであることがb)において特定されたそれぞれの患者エキソンの核酸配列を決定する工程。

10

【0041】

本明細書および請求項を通して、表現「含む(“comprise”、“comprises”および“comprising”)は、文脈が別途要求する場合を除き、非排他的意味で使用される。

【0042】

本発明が、明確化および理解のために少し詳しく記載されているが、本明細書中に記載される実施形態および方法に対する様々な改変および変化が、本明細書において開示される本発明の概念の範囲から逸脱することなく行われ得ることが当業者には明らかである。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0043】

現下の研究に先立って、SCN2A遺伝子における変異が2つのBFNIS家族において認められていた。この発見は、早期小児てんかんのさらなる家族の分析によってさらに詳しく述べられており、その結果、これらのてんかんタイプにおけるSCN2Aの変異の分子的臨床相関を精緻化している。

【実施例1】

【0044】

新生児てんかんおよび乳児てんかんにおけるSCN2A変異分析

現下の研究では、3組の対象が、SSCP分析および配列決定を使用してSCN2Aの変異について調べられた。これらには、臨床評価に基づいてBFNISと推定される2家族と、ほとんどの個体が発作(痙攣)を生後4ヶ月までで有したという事実に基づいてBFNISの可能性を有し、また、数家族において、新生児発作(痙攣)が認められた9家族と、他の早期小児てんかんを構成するさらなる103家族とが含まれた。これらの103家族において、10家族がBFNISを有し、59家族が、熱性発作プラスを伴う全身性てんかん(GEFS+)を有し(これらの家族では、SCN1A、SCN1BおよびGABRG2における変異が検出されなかった)、32家族が、中心側頭(cenotemporal)スパイクを伴う良性の小児てんかんを有する非関連の症例を構成していた。

30

【0045】

これらの家族におけるSCN2Aの変異分析の結果は、進化的に保存されたアミノ酸での変化を生じさせるミスセンス変異が合計で6家族において見出されたことを示した。BFNISが推定されるとして類別された2家族、および、BFNISの可能性があると見なされた9家族中4家族が陽性であった。これらの家族における変異は対照では見出されなかった。

40

【0046】

59のGEFS+家族では変異が見出されなかった。新生児での発症のみを有する2家族はいずれも、SCN2Aの変異を有していなかった。BFNISの10家族のうち、A1822Vの変化が1つの家族のうち2人で認められ、一方、中心側頭スパイクを伴う良性の小児てんかん群に由来する1人の子供が、正常な集団では認められなかったSCN2A

50

における T 1 2 0 0 A の変化を有していた。

【 0 0 4 7 】

現下の研究から、S C N 2 A の変異を有するさらなる家族の臨床的および分子的な特徴づけにより、今回、B F N I S が乳児期早期の重要なナトリウムチャネル障害として明らかにされる ( B e r k o v i c 他、2 0 0 4 ) 。

【 実施例 2 】

【 0 0 4 8 】

診断方法 - アッセイシステム例

本研究の知見に基づいて、B F N I S、B F N S または B F I S を患者において診断するための方法が確立されている。図 1 におけるフローチャートは、S C N 2 A 遺伝子における変化が B F N I S の原因であるという可能性を決定するために使用することができ、また、さらには、B F N S または B F I S の診断を行うために使用することができる本発明に基づき方針を例示する。さらに、図 2 におけるフローチャートは、新生児発作 ( 痙攣 ) または乳児発作 ( 痙攣 ) の患者が、B F N I S、B F N S または B F I S を有する可能性を明らかにするために使用することができる、分子生物学に基づく方針を例示する。これは、B F N I S が S C N 2 A の変化に関連し、B F N S が K C N Q 2 または K C N Q 3 の変化に関連し、B F I S がこれらの遺伝子のいずれかでの変化にも関連しないという事実に基づいている。

10

【 0 0 4 9 】

診断方法のために選ばれるアッセイ組合せの前には、調べられる患者集団が選択され、D N A がサンプル集団から得られる。サンプル集団は、てんかんを有する任意の個体を包含することができるが、サンプル集団では、発作 ( 痙攣 ) の発症が生後 6 ヶ月までである患者が注目されると考えられる。

20

【 0 0 5 0 】

検査患者由来の D N A を数多くの方法で得ることができる。最も一般的な方法は、患者から採取された血液サンプルから D N A を得ることであるが、D N A はまた、あまり侵襲的でない方法を使用して得ることができ、例えば、ほお細胞塗抹標本などから得ることができる。

【 0 0 5 1 】

現下の研究のために、D N A を、採取された血液から、Q I A a m p D N A B l o o d M a x i キット ( Q i a g e n ) を製造者の説明書に従って使用して、または、W y m a n および W h i t e ( 1 9 8 0 ) から適合化された手法によって抽出した。Q I A a m p キットを使用して得られた D N A サンプルについては、最終的なエタノール沈殿工程が用いられ、D N A ペレットを滅菌水に再懸濁した。ストック D N A サンプルを 2 0 0 n g / μ l の濃度で保存し、1 0 0 n g / μ l の希釈物をその後の P C R 反応のために調製した。

30

【 0 0 5 2 】

上記で記載されたアッセイシステムの任意の組合せを、この方法を使用して用いることができる。下記には、本研究において S C N 2 A 遺伝子における変化を検出するために、また、その種類を決定するために用いられたアッセイの例が示される。K C N Q 2 および / または K C N Q 3 における変化を検出するために用いることができるアッセイが国際特許出願公開 W O 9 9 / 2 1 8 7 5 ( その内容は参考として本明細書中に組み込まれる ) に記載される。

40

【 0 0 5 3 】

S S C P を使用する S C N 2 A 電気泳動アッセイ - S C N 2 A の変化の存在を特定する

患者由来の D N A が得られると、S C N 2 A 遺伝子の個々のエキソンの P C R 増幅を、一本鎖高次構造多型 ( S S C P ) 分析による分析の前に用いた。表 1 には、S C N 2 A 遺伝子の各エキソンを分析するために用いることができ、また、本研究で使用されたプライマーの一覧が示される。

【 0 0 5 4 】

50

この特定の例では、SSCPのために使用されたプライマーはその5'端がHEXにより標識され、典型的なPCR反応が10 $\mu$ lの総体積において行われた。すべてのPCR反応液は、67mMのTris-HCl (pH 8.8); 16.5mMの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 6.5 $\mu$ MのEDTA; 1.5mMのMgCl<sub>2</sub>; 200 $\mu$ Mの各dNTP; 10%のDMSO; 0.17mg/mlのBSA; 10mMの $\beta$ -メルカプトエタノール; 5 $\mu$ g/mlの各プライマー、および100U/mlのTaq DNAポリメラーゼを含有した。PCR反応を、典型的には、94 $^{\circ}$ Cで30秒間、60 $^{\circ}$ Cで30秒間および72 $^{\circ}$ Cで30秒間の10サイクル、その後、94 $^{\circ}$ Cで30秒間、55 $^{\circ}$ Cで30秒間および72 $^{\circ}$ Cで30秒間の25サイクルを使用して行った。72 $^{\circ}$ Cで10分間の最後の伸長反応が続いた。

10

#### 【0055】

50% (v/v) のホルムアミド、12.5mMのEDTAおよび0.02% (w/v) のプロモフェノールブルーを含む10 $\mu$ l~20 $\mu$ lの負荷用色素を、完了した反応液に加え、続いて、反応液を、架橋比が35:1 (アクリルアミド:ビス-アクリルアミド) であり、2%のグリセロールを含有する非変性の4%ポリアクリルアミドで泳動した。ゲルの厚さは100 $\mu$ mであり、幅が168mmであり、長さが160mmであった。ゲルを18 $^{\circ}$ Cで1200ボルトおよび約20mAで泳動し、製造者の説明書に従ってGel Scan 2000システム (Corbett Research、オーストラリア) で分析した。

20

#### 【0056】

##### DNA配列決定アッセイ - SCN2Aの変化の種類を特定する

立体配座の変化を示したSSCP分析からのPCR生成物を、その変化の種類を決定するために二次アッセイ (例えば、DNA配列決定) に供した。本実施例で示される例では、最初、バンドシフトを示しているアンプリコンを関連した患者から再増幅することを伴い (この場合に使用されたプライマーは5' HEX標識を含有しなかった)、その後、PCR増幅されたテンプレートを、QiaQuick PCR preps (Qiagen) を製造者の手順に基づいて使用して配列決定のために精製した。精製されたアンプリコンを配列決定するために使用されたプライマーは、最初の増幅工程のために使用されたプライマーと同一であった。それぞれの配列決定反応のために、25ngのプライマーおよび100ngの精製されたPCRテンプレートを使用した。BigDye配列決定キット (ABI) を製造者の説明書に従ってすべての配列決定反応のために使用した。生成物をABI 377シーケンサーで泳動し、EditViewプログラムを使用して分析した。

30

#### 【0057】

その後、患者のサンプルから得られたDNA配列の比較を、SSCPによって検出された立体配座の変化をもたらすDNA変化を検出するために、野生型SCN2A配列のDNA配列と直接に行うことができる。DNAの変化がSCN2A遺伝子における既知の多型でないならば、その変化は、疾患を引き起こしている変異であり得ることが考えられ、これにより、本質的には、さらなる家族メンバーの分析によってさらに調査され得る診断がもたらされる。

40

#### 【0058】

##### さらなるアッセイ - dHPLCアッセイ

上記アッセイに加えて、他のアッセイを、BFNISに関連するSCN2A遺伝子における変化の存在について検査するために用いることができる。1つのそのようなアッセイが高速液体クロマトグラフィー (dHPLC) である。この技術では、患者から得られたDNAが最初にSCN2A遺伝子の個々のエキソンについてPCR増幅される。SSCP分析のために用いられたプライマー (表1を参照のこと) もまたdHPLC分析のために使用することができる。

#### 【0059】

dHPLCのPCR反応およびサイクル処理条件を、SSCP分析について上記で記載されたように行うことができる。しかし、増幅が調査中のアンプリコンのみについて特異

50

的な識別できる生成物をもたらすならば、任意のPCR反応条件およびサイクル処理条件を用いることができる。

【0060】

代替りのPCR反応条件の一例は、反応が、1X PCR緩衝液 (Invitrogen)、200 μMの各dNTP、300 ngの各プライマー、1.5 mMのMgCl<sub>2</sub>、100 ngのDNA、および0.5ユニットのTaq DNAポリメラーゼ (Invitrogen) を含有する20 μlの総体積において行われる場合である。PCRサイクル処理条件は、アンプリコンの種類およびプライマー配列に依存して変化するが、典型的には、94 で2分間の1サイクル、その後、60 で30秒間、72 で30秒間および94 で30秒間の10サイクル、その後、55 で30秒間、72 で30秒間および94 で30秒間の25サイクルを伴うことができる。55 で30秒間の最後のアニーリング反応、その後、72 で10分間の伸長反応により、通常、サイクル処理が完了する。

10

【0061】

dHPLC分析に先立って、PCR生成物は95 に5分間加熱され、その後、(25 に達するまで) 1.5分間あたり-3 の割合でゆっくり冷却される。これにより、PCR生成物のヌクレオチド構成に依存して、ヘテロ二重鎖およびホモ二重鎖の形成が可能になる。

【0062】

様々なdHPLCシステムをヘテロ二重鎖分析および変異検出のために使用することができる。1つの例がTransgenomic WAVE (登録商標) システムである。dHPLCで変異を検出するために、各生成物は、部分的変性条件のもとで泳動されることが要求される。SCN2A遺伝子の各アンプリコンは異なる配列を有するために、各生成物を部分的に変性させる温度を最初に計算する必要がある。

20

【0063】

アンプリコンがdHPLCカラムに供給され、コンピューターにより作成されたクロマトグラムが患者のサンプルと野生型サンプルとの間で比較される。分析はクロマトグラムの目視検査によって行うことができ、また、Transgenomic WAVE (登録商標) システムの場合には、システムとともに供給されるソフトウェアを使用して行うことができる。野生型に対して異なるピークパターンを示すそのような患者サンプルは、調査中のSCN2Aアンプリコンに変化を含有すると見なされ、そのような個体に由来するDNAは、SCN2Aの変化の種類を決定するために、また、その変化がBFNISに関係する可能性を予測するために、さらなるアッセイ (すなわち、DNA配列決定) に供することができる (上記実施例を参照のこと)。

30

表 1

S C N 2 A の変異分析のために使用されるプライマー配列

エキソン	フォワードプライマー	リバースプライマー	サイズ (bp)
5' UTR	ACAGGAAGTTAGGTGTGGTC	GAGAAGCATCACAGAG	206
1a	TGCTGTATCTCAGTGCCTCAG	TCATCATCCTCATCCTTGCG	281
1b	GCTAAGAGACCCAAAC	TAGGCAGTGAAGGCAACTTG	201
2	GGCACTATTTTACAGGGC	CATAACATTGCCAACCACAG	325
3	TGGTGAAGGCATGGTAGT	ATTGAGGAGGTCTCAAGGTG	239
4	ACCAACCTGGAAGTGTCT	ATAGTATAGGCTCCCACCAG	300
5	AGGCCCCCTTATATCTCCAAC	TAGCAACAAGGCTTCTGCAC	244
5n	GATGAAAGACCAAGGAAGAC	TGGAGATATAAGGGGCTAG	200
6a	TTCCAGGACAAGCTCATG	GGAAGAATTATCTGGAGGCCA	249
6b	TTGTTTCATGGGCAACCTACG	GTCTAAGTCACTTGATTAC	271
7	GTGAGCTTTGCCACCTAAAC	TGAGAGTCACCGTGAAGTAG	280
8	ACCAATTAGCAGACTTGCCG	CTACAGCAATTCTCTTGAG	264
9	CTCAAGAGAATTGCTGTAG	AGGACCGTATGCTTGTTCAC	326
10a	TTCCACATACTTTGCGCCCTTC	GCTGTCTTCCAGATTCCGA	235
10b	CAGAAAGAACAGTCTGGAG	CTCTGAAAGCATTGTGCCA	256
11a	CCACATGTCCAATGAC	CACGAACAGAGAGTCTCTTC	296
11b	TGATGAGCACAGCACCTTTG	CACCAGTCACAACTCTCTTC	281
12	CTTTGGGCTTTGCTGCTTTC	AAGTAACTGTGACGCAGGAC	222
13a	CCTCCAGCAGATTAACCCAT	CAGGTCAACAATGGGTCCA	268
13b	ACACCTTGTC AACCTGGTTG	GATGTCAAGATATACATGGCC	258
14	CCCGTGTTC AAGAGTATTTGCTC	GCTTATGAACACTCCCAG	252
15a	GCAGAGCATTAACACTGTTC	AGCGTGGGAGTTCACAATCA	241
15b	GCATGCAGCTCTTTGGTAAG	CCCTTCAGTTGAACACAC	299
16a	CCTGTTTTCTCCTGCTGTGTTT	GCCACTAGTAGTCCATTTCCGTC	336
16b	GACAGCTGTATTTCCAACC	AACAGGAAGGAAACACGC	346
17	CTGACCTTTACCAAGCGGA	GAGGATACTCAAGACCAC	318
18	TGAATCTCCCAACAC	GAGTGGATCATGCATCACCT	252
19	CTTAGGCACCTGATAAGAGC	AAAGCAGCAAAGTGCAGC	302
20	CATTGCATAGAGCAAGGC	GGTACAAAGTGTCACTGCTCTC	263
21a	TTTCCTTCTCATCCTGTGCC	CTGGCAGTTTGTGCTCTC	240
21b	AGCGTGGTCAACAACACTACAG	GCCATTCTAACAGGTGGA	217
22	GCCCCAAAAGTGAATAC	GCGCCAATTTCCCTCTAACTAGAC	224
23	GGGCCCAGAGATTA AACATGC	CAGAGCAAGGATGAAG	272
24	GAATGAAATGTGGGAGCC	TTCGGGCTGTGAAACGGTTA	266
25a	TTACCTCAGCTCTCCAATCACTGG	TGGTCATCGGTTTCCACCAT	292
25b	TCATCTGCCTTAACATGGTC	GGGAGTTTGGGATGAATG	311
26a	GTACCTAACTGTCTGTTCAC	TAAACAACGCAGGAAGGGAC	270
26b	CACGCTGCTCTTTGCTTTGA	GATCTTTGTCAAGGTCACAG	269
26c	GGATGGATTGCTAGCACCTA	TCGCATCGGGATCAAACCTC	281
26d	AGCCTCTGAGTGAGGATGAC	TCCATCTGTATTCTGAAGGGC	277
26e	GTGAGAGTGGAGAGATGGAT	TATCATACGAGGGTGGAGAC	330
26f	AACCGATATGACGCCTTCCA	GGTCTCTGCTTGTATAGGC	288

注：プライマー配列は5'から3'の方向に掲載されている。エキソン1, 6, 10, 11, 13, 15, 16, 21, 25および26はサイズが大きいため、これらのエキソンは2つまたはそれ以上の重複するアンプリコンに分割された。新生児で発現するエキソン5はエキソン5nとして表わされる。

10

20

30

参考文献

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

- Annegers, JF. (1996). *The treatment of epilepsy: Principles and practice*. Second Edition. (Wyllie E (Ed) Williams and Wilkins).
- Berkovic, SF. et al. (2004). *Ann. Neurol.* 55: 550-557.
- Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy. (1989). *Epilepsia* 30: 389-399. 10
- Gardiner, M. (2000). *J Neurol.* 247: 327-334.
- Guipponi, M. Rivier, F. Vigeveno, F. Beck, C. Crespel, A. Echenne, B. Lucchini, P. Sebastianelli, R. Baldy-Moulinier, M and Malafosse, A. (1997). *Hum. Mol. Genet.* 6: 473-477.
- Heron, SE. Crossland, KM. Andermann, E. Phillips, HA. Hall, AJ. Bleasel, A. Shevell, M. Mercho, S. Seni, M. Guiot, M. Mulley, JC. Berkovic, SF. Scheffer, IE. (2002). *Lancet* 360:851-52. 20
- Kaplan, RE. and Lacey, DJ. (1983). *Am. J. Med. Genet.* 16: 595-599.
- Maxam, AM. and Gilbert, W. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 560-564.
- Plouin, P. (1994). In: Malafosse, A. Genton, P. Hirsch, E. Marescaux, C. Broglin, D. and Bernasconi, R. eds. *Idiopathic generalised epilepsies: clinical, experimental, and genetic aspects*. London: John Libbey and Company. 39-44. 30
- Sanger, F. Nicklen, S. and Coulson, AR. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Sutton, GC. (1990). *The principles and practice of medical genetics*. Second Edition. (Churchill Livingstone, NY).
- Szepietowski, P. Rochette, J. Berquin, P. Piussan, C. Lathrop, GM. And Monaco, AP. (1997). *Am. J. Hum. Genet.* 61: 889-898.
- Wyman, AR. and White, R. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 6754-6758. 40

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】SCN2A遺伝子における変化がBFNISの原因であるという可能性を決定するために使用することができ、また、さらには、BFNSまたはBFISの診断を行うために使用することができる本発明に基づく方針を例示する本発明の1つの実施形態によるフローチャートである。

【図2】新生児発作（痙攣）または乳児発作（痙攣）の患者が、BFNIS、BFNSまたはBFISを有する可能性を明らかにするために使用することができる、分子生物学に基づく方針を例示する本発明の1つの実施形態によるフローチャートである。 50

【配列表フリーテキスト】

【0065】

配列番号1～配列番号84は、SCN2Aの変異分析のために使用されるプライマー配列である。

【図1】

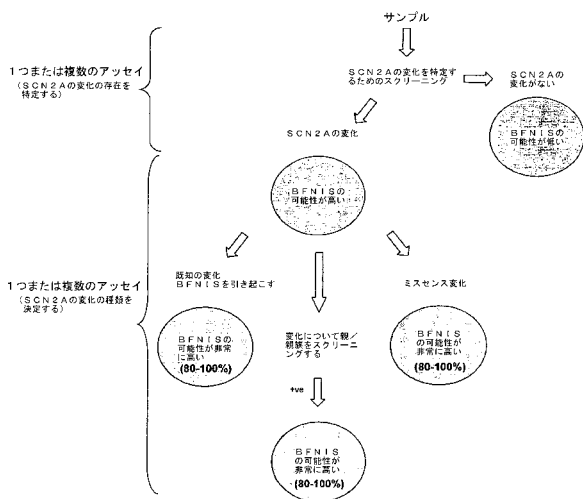


FIG. 1

【図2】

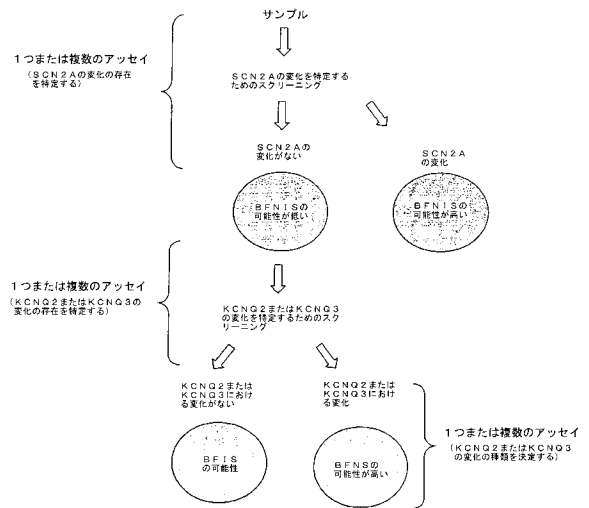


FIG. 2

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2004/001399		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>				
Int. Cl. <sup>7</sup> : C12Q 1/68				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) SEE BELOW				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched SEE BELOW				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPIDS, MEDLINE, CA: epilepsy, BFNIS, SCN2A, sodium channel alpha subunit, voltage gated sodium channel.				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
PX	Berkovic SF et al (2004) "Benign familial neonatal-infantile seizures: Characterization of a new sodium channelopathy" Ann Neurol 55, 550-7 See whole document	1-27		
X	Heron SE et al (2002) "Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures" The Lancet 360, 851-2 See whole document	1-27		
X	Mulley JC et al (2003 April) "Channelopathies as a genetic cause of epilepsy" Current Opinion in Neurology 16, 171-6 See whole document	1-27		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex				
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="vertical-align: top;"> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>			
Date of the actual completion of the international search 4 November 2004		Date of mailing of the international search report 10 NOV 2004		
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer  <b>TERRY MOORE</b> Telephone No : (02) 6283 2632		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
**PCT/AU2004/001399**

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2003 008574 A (BIONOMICS LIMITED) 30 January 2003 See whole document	1-27

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/AU2004/001399

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: **8 in part**  
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:  
  
Claim 8 has only been searched in part because the claim is not limited to the technical features of the invention. The use of "and/or" in the claim means that the claimed method does not necessarily involve testing for alterations in the SCN2A gene, a feature that is considered to be integral to the invention. As such the search has been restricted to methods that involve testing for alterations in the SCN2A gene and the KCNQ2 and/or 3 genes..
  
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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 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.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/AU2004/001399**

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report	Patent Family Member
WO 03008574      CA 2454073	EP 1407013
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.	
END OF ANNEX	

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ベルコヴィック, サミュエル, フランク  
オーストラリア, ヴィクトリア 3161, カウルフィールド ノース, ポロ パレード  
7

(72) 発明者 ヘロン, サラ, エリザベス  
オーストラリア, サウス オーストラリア 5089, ハイブリー, キンナード クレセント  
8

(72) 発明者 マレイ, ジョン, チャールズ  
オーストラリア, サウス オーストラリア 5046, フィルレ, ダンクレイ アベニュー  
13

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA02 HA12

4B063 QA13 QA17 QA19 QQ43 QR08 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34  
QX01

专利名称(译)	新生儿癫痫综合征或婴幼儿癫痫综合征的诊断方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007537712A</a>	公开(公告)日	2007-12-27
申请号	JP2006534540	申请日	2004-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	生态学有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物卢武铉搭配有限公司		
[标]发明人	シェッファー・イングリッド・アイリーン ベルコヴィック・サミュエル・フランク ヘロン・サラ・エリザベス マレイジョン・チャールズ		
发明人	シェッファー, イングリッド, アイリーン ベルコヴィック, サミュエル, フランク ヘロン, サラ, エリザベス マレイ, ジョン, チャールズ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/156		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.M G01N33/566		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/HA12 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX01		
代理人(译)	Kazehaya信明 浅野纪子		
优先权	2003905565 2003-10-13 AU		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

一种在患者中诊断新生儿癫痫综合征或婴幼儿癫痫综合征作为BFNIS的方法，包括检查患者样品中SCN2A基因（包括基因的调节区）的变化，当检测到没有检测到SCN 2A的变化时，建立表示检测到BFNIS的可能性高的诊断或建立表示BFNIS的可能性低的诊断。

表 1  
SCN2Aの変異分析のために使用されるプライマー配列

エキソン	フォワードプライマー	リバースプライマー	サイズ (bp)
5' UTR	ACAGGAAGTTAGGTGTGGTC	GAGAAGATCACAGAG	206
1a	TGGCTATCTCAGTCTCGAG	TCATGATCCCTATCCTTGGC	281
1b	GCTAAGAGACCCARAC	TAGGCAGTGAAGGAACTTG	201
2	GGACTATTTACAGGGG	CATACATTTGCCACCCAGAG	325
3	TGGTAAGGCATGGTAGT	ATTGAGGAGTCTCAAGGTG	239
4	ACCACCTGGAGTGTCT	ATAGATAGGCTCCACCCAG	300
5	AGGCCCTTATCTCCAAAC	TAGCAACAGGGTCTCTCCAC	244
5n	GATGAAGACCAGGAAGAC	TGGAGATATAGGGGCTTAG	200
6a	TTCCGGCAAGGCGATC	GGAGATATTTGTGAGGGCCA	249
6b	TTGTTATGGGCAACTACG	GTCTAAGTCACTTGAATCAC	271
7	GTGAGCTTTGGACCTAAAC	TGAGATCACCGTGAAGTAG	280
8	ACCATATGGACGCTTGGC	CTCAGACATTTCTTTGAG	264
9	CTCAAGAGATTGGTGTAG	AGGACCTATGCTTGTTCAC	326
10a	TTCCAGATATCTTTGGGCTTC	GTCCTTCCAGATTCGCA	235
10b	CAGAAGAACACTCTGGAC	CTCTGAAGCATTTGTGCCA	256
11a	CCACATGTCCAATGAC	CACCAACAGAGATCTCTTC	296
11b	TGATGAGCACAGCACCTTTG	CACCAGTCAACAATCTCTTC	281
12	CTTTGGGCTTTCGCTGCTTC	AAGTAACGTGACGAGGAC	222
13a	CCTCCGGGAGATTAACCAAT	CAGGTCACAGAAATGGTCCA	268
13b	ACACCTTGTCAACCTGGTTG	GATGTCAGATATACATGGCC	258
14	CCGCTTTTCAAGAGATTTGGCTC	GCTTTTCAAGAGTGGCAG	252
15a	GCAGAGCATTAACACTGTTT	AGCGTGGGATTCACAAATCA	241
15b	GGATGCAGCTCTTTGGTAAG	CCCTTCAGTTGAAACACAC	299
16a	CCCTTTTCCCTGCTGGTTC	CCCACTAAGTATTCCTTTGGTTC	316
16b	GACAGCTGTATTTCCACACC	AACAGGAAGGAACACGCC	346
17	CTGAGCTTTACGAAAGGGGA	GAGGATCTCAAGGACAC	318
18	TGAATCTCCACCCAGAC	GATGGATCATGCATCAGCT	252
19	CTTAGCCACTGATTAAGAGC	AAGCAAGAAAGTCCAGC	302
20	CATTGCATAGAGCAGGC	GGTACAAGGTCCAGTCTGCTCTC	263
21a	TTCTCTCTCATCTCTGTGCC	CTGGCAGTTTATTTGCTCTC	240
21b	AGCCTTCCAGAGATTAAG	GGCATTCAAGAGGCTGGA	217
22	GCCCCAAGTGAATAC	CCGCCAATTTCCCTTAACTAGAC	224
23	GGCCGAGAGTTTAAAGATGG	CCAGCAAGGATGAG	272
24	GAATGAATGTGGAGGCC	TTCCGGCTGTGAACCGTTA	266
25a	TACCTCAGCTTCCAAATCAGTGG	TGGTCACTGGTTTCCACCAT	292
25b	TCACTGCTTACAGATGCT	GGGATTTGGGATGAGT	313
26a	GTACTTAAGTCTCTGTTAC	TAAACAGCGAGGAGGAGC	270
26b	GATCTTTCTGAGGCTTGG	GATCTTTCTGAGGCTTGG	269
26c	GGATGGATTCCTAGCACCTA	TCCGATCGGGATCAAACTTC	281
26d	AGCCTTGAGTGAAGATGAC	TCCATCTGATTTGAAAGGGC	277
26e	GTGAGATGGAGATGAGT	TCTCACTCAAGGCTTGGAGC	320
26f	AACGATATGACGCTTCCA	GCTCTGCTCTGTTATAGGC	288

注：プライマー配列は5'から3'の方向に掲載されている。エキソン1、6、10、11、13、15、16、21、22をおよび26はサイズが大きい。これらのエキソンは2つまたはそれ以上の重複するアンプリコンに分割された。新生児で発現するエキソン5はエキソン6として