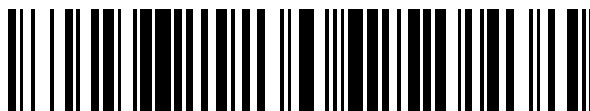


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 624**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/01** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2004 E 04718885 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 1606418**

54 Título: **Métodos para el diagnóstico y el tratamiento de la epilepsia**

30 Prioridad:

**27.03.2003 AU 2003901425**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**22.07.2014**

73 Titular/es:

**BIONOMICS LIMITED (100.0%)  
31 DALGLEISH STREET  
THEBARTON, SOUTH AUSTRALIA 5031, AU**

72 Inventor/es:

**PETROU, STEVEN;  
BERKOVIC, SAMUEL, FRANK y  
SCHEFFER, INGRID, EILEEN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 478 624 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos para el diagnóstico y el tratamiento de la epilepsia

## 5 Área técnica

La presente invención se refiere al diagnóstico y el tratamiento de la epilepsia, particularmente de la epilepsia mioclónica grave infantil (SMEI).

## 10 Antecedentes técnicos

Las epilepsias constituyen una colección variada de trastornos cerebrales que afectan a alrededor del 3% de la población en algún momento de su vida (Annegers, 1996). Una crisis epiléptica se puede definir como un cambio episódico en el comportamiento causado por la activación desordenada de las poblaciones de neuronas del sistema nervioso central. Esto resulta en diferentes grados de contracción muscular involuntaria y a menudo en pérdida de la conciencia. Los síndromes epilépticos se han clasificado en más de 40 tipos distintos basados en síntomas característicos, tipos de crisis, causa, edad de inicio y patrones EEG (Comisión de clasificación y terminología de la Liga Internacional contra la epilepsia, 1989). Sin embargo la única característica que es común a todos los síndromes es el persistente aumento de la excitabilidad neuronal que se expresa tanto ocasional como imprevisiblemente como una crisis.

Se ha estimado que en aproximadamente el 40% de las personas afectadas está presente una contribución genética a la etiología de la epilepsia (Gardiner, 2000). Como las crisis epilépticas pueden ser el punto final de una serie de aberraciones moleculares que en última instancia perturban la sincronía neuronal, es probable que la base genética de la epilepsia sea heterogénea. Hay más de 200 enfermedades mendelianas que incluyen la epilepsia como parte del fenotipo. En estas enfermedades, las crisis epilépticas son sintomáticas de la implicación neurológica subyacente como alteraciones en la estructura o función cerebrales. En contraste, también hay una cantidad de síndromes epilépticos "puros" en los cuales la epilepsia es la única manifestación en los individuos afectados. Éstos se denominan idiopáticos y representan más del 60% de todos los casos de epilepsia.

Las epilepsias idiopáticas se han dividido además en los subtipos parcial y generalizada. Las crisis epilépticas parciales (focales o locales) surgen de descargas corticales localizadas, de modo que sólo ciertos grupos de músculos están implicados y puede mantenerse la conciencia (Sutton, 1990). Sin embargo, en la epilepsia generalizada, la descarga EEG no muestra ningún foco de modo que todas las regiones subcorticales del cerebro están involucradas. Aunque la observación de que las epilepsias generalizadas son con frecuencia heredadas es comprensible, el mecanismo por el cual los defectos genéticos, que presumiblemente se expresan constitutivamente en el cerebro, dan lugar a crisis parciales es menos claro.

Las epilepsias idiopáticas generalizadas (IGE) son el grupo más común de epilepsia humana heredada y no tienen una herencia simple. Se conocen dos grandes grupos de IGE, las epilepsias idiopáticas generalizadas clásicas (Comisión de clasificación y terminología de la Liga Internacional contra la epilepsia, 1989) y el síndrome genético recientemente reconocido de epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus (GEFS<sup>+</sup>) (Scheffer y Berkovic, 1997; Singh et al., 1999).

Las IGE clásicas se dividen en una serie de subsíndromes clínicamente reconocibles pero superpuestos que incluyen epilepsia de ausencias de la niñez, epilepsia de ausencias juvenil, epilepsia mioclónica juvenil, etc. (Comisión de clasificación y terminología de la Liga Internacional contra la epilepsia, 1989; Roger et al., 1992). Los subsíndromes se identifican por la edad de inicio y el patrón de los tipos de crisis (ausencia, mioclonía y tónico-clónicas). Algunos pacientes, particularmente los que tienen solamente crisis tónico-clónicas no se ajustan a un subsíndrome específicamente reconocido. Los argumentos para considerar a éstos como síndromes separados, aun reconociendo que son parte de un continuo neurobiológico, han sido presentados previamente (Berkovic et al., 1987; 1994; Reutens y Berkovic, 1995).

GEFS<sup>+</sup> fue reconocida originalmente a través de grandes familias de múltiples generaciones y comprende una diversidad de subsíndromes. Las convulsiones febriles plus (FS<sup>+</sup>) es un subsíndrome en el que los niños tienen convulsiones febriles que ocurren fuera del rango de edad de 3 meses a 6 años, o tienen convulsiones tónico-clónicas febriles asociadas. Muchos miembros de la familia tienen un fenotipo indistinguible del síndrome de convulsiones febriles clásico y algunos tienen FS<sup>+</sup> con crisis adicionales de ausencia, mioclónicas, atónicas o complejas parciales. El extremo grave del espectro de GEFS<sup>+</sup> incluye la epilepsia mioclónica astática.

En las familias GEFS<sup>+</sup>, el análisis de ligamiento en las poco frecuentes grandes familias multigeneración con evidencia clínica de un gen autosómico dominante principal ha demostrado locus en los cromosomas 19q y 2q. Se han confirmado ambos locus GEFS<sup>+</sup> 19q y 2q en familias numerosas comprobadas independientemente, y se identificaron defectos genéticos. Se conocen familias vinculadas a 19q y se identificó una mutación en el gen para la

subunidad  $\beta 1$  del canal neuronal del sodio (SCN1B) (Wallace et al., 1998). Esta mutación da lugar a la pérdida de un puente disulfuro crítico de esta subunidad reguladora y provoca una pérdida de función in vitro. También se conocen familias vinculadas a 2q y se identificaron mutaciones en la subunidad  $\alpha$  de formación del poro del canal neuronal del sodio (SCN1A) (PCT/AU01/01648; Escayg et al., 2000).

5 La epilepsia mioclónica grave infantil (SMEI) se clasifica como un síndrome epiléptico que se manifiesta como crisis generalizadas y focales (parciales) (Comisión de clasificación y terminología de la Liga internacional contra la epilepsia, 1989). La SMEI comienza con convulsiones hemiclónicas febriles y afebriles prolongadas y generalizadas en el primer año de vida. Entre el primero y los cuatro años de vida, evolucionan otros tipos de crisis incluidas las crisis mioclónicas, de ausencia y atónicas. El desarrollo neurológico es normal en la infancia con un enlentecimiento progresivo después de los dos años. A menudo existen antecedentes familiares de epilepsia y/o convulsiones febriles en pacientes con SMEI y un trabajo reciente ha demostrado que integrantes de la familia tienen fenotipos de epilepsia compatibles con el espectro de GEFS<sup>+</sup> (Singh et al., 2001; Veggiotti, 2001). Desde una perspectiva clínica, como GEFS<sup>+</sup> y SMEI implican convulsiones relacionadas con fiebre, se pensó que los genes del canal del sodio podían ser el blanco para las mutaciones en individuos afectados por SMEI. Este hecho se confirmó más adelante cuando se identificaron mutaciones en el gen SCN1A en los pacientes con SMEI (Claes et al., 2001; Ohmori et al., 2002). Es interesante que cada una de estas mutaciones fueron *de novo*, un hecho difícil de reconciliar basándose en la experiencia clínica de que un número significativo de casos de SMEI tiene antecedentes familiares de GEFS<sup>+</sup>.

20 Es importante desarrollar una prueba de diagnóstico molecular para ayudar al diagnóstico precoz de SMEI. Dicha prueba dirigiría la estrategia correcta de tratamiento para los pacientes que podrían verse afectados por SMEI y podría predecir el riesgo de agravamiento de las convulsiones debido a factores como la fiebre inducida por vacunación u otras causas. Los estudios clínicos para determinar la base molecular de la SMEI han sido variables en sus resultados y no han sido concluyentes en cuanto a una sola base molecular para la SMEI, particularmente dado que las alteraciones en el gen SCN1A están involucradas en otros subtipos de epilepsia. Los inventores han reconocido la necesidad de una prueba diagnóstica predictiva para la SMEI y por lo tanto, han creado un método que supera las limitaciones identificadas en los estudios clínicos anteriores y determina la probabilidad de que un paciente con epilepsia sufra de SMEI basándose en un análisis molecular del gen SCN1A.

30 Divulgación de la invención

En un primer aspecto de la presente invención se proporciona un método para diagnosticar predictivamente la probabilidad de que un paciente sufra de SMEI que comprende:

- 35 (i) secuenciar el gen SC1NA de un paciente con el fin de detectar una mutación en el gen SCN1A del paciente, incluida en una región reguladora del gen, en una muestra del paciente;
- (ii) determinar si la mutación ha sido detectada previamente, o no, en el gen SCN1A de los sujetos y se sabe que está asociada a la SMEI, o no ha sido asociada previamente a la SMEI, donde, cuando la mutación identificada no ha sido asociada previamente a la SMEI, los padres o familiares del paciente también se someten a análisis para determinar si la mutación del paciente ha surgido *de novo*.
- 40

donde dicho diagnóstico predictivo de riesgo de SMEI es de la manera siguiente:

- 45 (a) si la mutación ha sido asociada previamente a la SMEI, entonces se prevé una alta probabilidad de riesgo de SMEI;
- (b) si la mutación es conocida y no ha sido asociada previamente a la SMEI, entonces se prevé una baja probabilidad de riesgo de SMEI; y
- (c) si la mutación no ha sido identificada previamente y se ha demostrado que ha surgido *de novo*, existe una alta probabilidad de riesgo de SMEI y un riesgo aún mayor si la mutación se identifica como una mutación de truncamiento.
- 50

Esta información es importante para iniciar el régimen de tratamiento correcto para un paciente. Los tratamientos actuales con fármacos antiepilépticos (AED) pueden agravar las crisis en algunos pacientes con epilepsia. Esto puede tomar la forma de mayor frecuencia de crisis, mayor gravedad de la crisis o aparición de un nuevo tipo de crisis. Con respecto a la SMEI, se sabe que carbamazepina, gabapentina, lamotrigina y vigabatrina pueden agravar las crisis (Bourgeois, 2003) mientras que el valproato ha demostrado ser beneficioso para los pacientes con SMEI (Scheffer y Berkovic, 2003).

55

Por lo tanto el método de diagnóstico de la presente invención proporcionará información importante para dirigir la selección primaria apropiada de AED en pacientes que se sospecha que tienen SMEI.

60

La naturaleza de las alteraciones en el gen SCN1A puede abarcar todas las formas de mutaciones en el gen que incluyen deleciones, inserciones, rearrreglos y mutaciones puntuales en las regiones codificantes y no codificantes como el promotor, los intrones o las regiones sin traducir. Las deleciones pueden ser de todo el gen o solamente de

una porción del gen mientras que las mutaciones puntuales pueden dar lugar a codones de parada, mutaciones del marco de lectura o sustituciones de aminoácidos. Las mutaciones puntuales se producen en las regiones reguladoras de SCN1A, como en el promotor, pueden conducir a la pérdida o disminución de la expresión del ARN o pueden abolir el procesamiento adecuado del ARNm provocando una disminución en la estabilidad o la eficacia de traducción del ARNm.

La identificación de las alteraciones en SCN1A en un paciente, que conducen a cambios más severos para la proteína SCN1A (como las mutaciones del marco de lectura y las mutaciones sin sentido que dan lugar a una proteína truncada) aumenta la probabilidad de que el paciente sufra de SMEI. Esta probabilidad aumenta aún más si se puede demostrar que la alteración es un cambio *de novo* en lugar de uno heredado de los padres o los familiares del paciente, o que la alteración en el gen SCN1A es una que ha sido asociada previamente a la SMEI. El diagrama de flujo de la figura 1 ilustra un aspecto de la presente invención.

En una realización se proporciona un método para el diagnóstico de la SMEI en un paciente que comprende realizar uno o más ensayos para analizar la existencia de una alteración en SCN1A e identificar la naturaleza de la alteración.

En otra realización se proporciona un método para el diagnóstico de SMEI en un paciente que comprende los pasos de:

- (1) realizar uno o más ensayos para analizar la existencia de una alteración en el gen SCN1A del paciente; y, si los resultados indican la existencia de una alteración en el gen SCN1A,
- (2) realizar uno o más ensayos para determinar la naturaleza de la alteración de SCN1A.

Se dispone de varios sistemas de ensayo que se pueden utilizar para analizar la existencia de una alteración en SCN1A y la invención no está limitada por los ejemplos que se proporcionan a continuación.

En una realización un sistema de ensayo empleado puede ser el análisis del ADN de SCN1A de una muestra de un paciente en comparación con el ADN del SCN1A silvestre. Se puede utilizar ADN genómico para el análisis diagnóstico y se puede obtener de varias fuentes, que incluyen, pero no exclusivamente, células del organismo, como las presentes en la sangre o la mejilla, biopsia de tejido, muestra quirúrgica o material de autopsia. El ADN se puede aislar y utilizar directamente para los ensayos diagnósticos o se puede amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) antes del análisis. Del mismo modo, también se pueden usar ARN o ADNc, con o sin amplificación por PCR. Además, se puede llevar a cabo el diagnóstico prenatal mediante el análisis de células fetales, células de la placenta o líquido amniótico.

En una realización específica, se puede emplear un ensayo de hibridación de ADN. Este puede consistir en un ensayo con sonda específico para el gen SCN1A. Dicho ensayo puede observar una serie de transferencias tipo Southern de ADN que ha sido digerido con una o más enzimas de restricción. Cada transferencia puede contener una serie de individuos normales y una serie de muestras de pacientes. Las muestras que presentan fragmentos de hibridación que difieren en longitud de la del ADN normal cuando se sonda con secuencias próximas o que incluyen el gen SCN1A (sonda de gen SCN1A) indican una posible alteración de SCN1A. Si se usan enzimas de restricción que producen fragmentos de restricción muy largos entonces se puede emplear electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

Se pueden emplear también ensayos de hibridación específicos para el exón de SCN1A. Este tipo de análisis con sondas utilizará al menos una sonda que se hibride específica y selectivamente a un exón del gen SCN1A en su forma silvestre. Así, la falta de formación de un ácido nucleico híbrido bicatenario que contenga la sonda de ácido nucleico es indicativa de la presencia de una alteración en el gen SCN1A. Debido a la alta especificidad de las pruebas con sonda, cualquier resultado negativo es altamente indicativo de la presencia de una alteración del SCN1A, sin embargo se deben emplear otros ensayos de investigación para identificar la naturaleza de la alteración a fin de determinar la probabilidad de que sea una alteración asociada a la SMEI.

El método de ensayo específico para el exón de SCN1A también se podría adaptar para identificar alteraciones de SCN1A que se determinó previamente que son responsables de la SMEI. En este aspecto, se utiliza una sonda que se hibrida específica y selectivamente con el gen SCN1A en su forma alterada (sonda específica para el alelo). En este caso, la formación de un ácido nucleico híbrido bicatenario que contenga la sonda de ácido nucleico es indicativa de la presencia de la alteración en el gen SCN1A. En cada variación del método de ensayo específico para el exón, es importante tener en cuenta los polimorfismos conocidos en el gen SCN1A que no están asociados a la SMEI. Se debería emplear posteriormente un ensayo secundario como la secuenciación de ADN para asegurar que cualquier alteración sospechosa no sea un polimorfismo conocido.

Las sondas específicas para los exones de SCN1A utilizadas para cada uno de los ensayos mencionados se pueden derivar de: (1) amplificación por PCR de cada exón del gen SCN1A usando cebadores específicos para el

intrón que flanquea cada exón; (2) las sondas de ADNc específicas para cada exón; o (3) una serie de oligonucleótidos que representan colectivamente un exón de SCN1A.

5 En otra realización, se puede emplear un ensayo para analizar la formación de un ADN heterobycatenario. Mezclando ADN de SCN1A silvestre desnaturalizado con una muestra de ADN de un paciente, todas las variaciones de secuencia en la secuencia de SCN1A entre las dos muestras dará lugar a la formación de una población mixta de ADN heterobycatenarios y homobycatenarios durante el reapareamiento del ADN. El análisis de esta población mixta se puede llevar a cabo mediante el uso de técnicas como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) que se realizan a temperaturas parcialmente desnaturalizantes. De esta manera, los ADN heterobycatenarios eluirán de la columna de HPLC antes que los homobycatenarios debido a su menor temperatura de fusión.

15 En otra realización, las muestras del paciente se pueden someter a ensayos electroforéticos. Por ejemplo se pueden emplear ensayos electroforéticos que determinen las diferencias de longitud del fragmento SCN1A. Los fragmentos de ADN genómico de cada paciente se amplifican con cebadores específicos del intrón del gen SCN1A. Por lo tanto, las regiones amplificadas del gen SCN1A incluyen el exón de interés, el sitio de corte y empalme en los límites del exón/intrón y una porción corta del intrón en cada extremo del producto de amplificación. Los productos de amplificación se pueden correr en una electroforesis en gel de separación por tamaño y las longitudes de los fragmentos amplificados se comparan con longitudes estándar conocidas y esperadas del gen silvestre para determinar si hay una mutación de inserción o deleción en la muestra del paciente. Este procedimiento se puede utilizar de manera ventajosa en un formato "multiplexado", en el cual los cebadores para varios exones (generalmente de 2 a 8) se coamplifican y evalúan simultáneamente en un único gel electroforético. Esto se torna posible mediante la selección cuidadosa de los cebadores para cada exón. Los fragmentos amplificados que abarcan cada exón están diseñados para ser de diferentes tamaños y por lo tanto reconocibles en un gel de separación por tamaño de electroforesis. El uso de esta técnica tiene la ventaja de detectar tanto los alelos normales como mutantes en los individuos heterocigotos. Además, mediante el uso de multiplexación puede ser muy rentable.

20 En otro método, los ensayos electroforéticos de diagnóstico para la detección de alteraciones de SCN1A previamente identificadas responsables de la SMEI, pueden utilizar cebadores de PCR que se unen específicamente a los exones alterados del gen SCN1A. En este caso, el producto sólo se observará en el gel de electroforesis si se produce la hibridación del cebador. Por lo tanto, la aparición del producto de amplificación es un indicador de la presencia de la alteración, en tanto la longitud del producto de amplificación puede indicar la presencia de alteraciones adicionales.

35 Se pueden emplear ensayos electroforéticos adicionales. Estos pueden incluir el procedimiento de polimorfismo conformacional de una sola hebra (SSCP) (Orita et al., 1989). Como se mencionó antes, los fragmentos del ADN genómico de cada paciente se amplifican por PCR con cebadores específicos para el intrón del gen SCN1A de modo que se amplifiquen los exones individuales del gen SCN1A y se puedan analizar individualmente. Luego, los productos de PCR específicos para el exón se someten a electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes de modo que los fragmentos de ADN migren por el gel basándose en su conformación dictada por la composición de su secuencia. Los fragmentos específicos del exón de SCN1A que difieren en secuencia de la secuencia del SCN1A silvestre tendrán una conformación de la estructura secundaria diferente y por lo tanto migrarán diferentemente a través del gel. Los productos de PCR que migran aberrantemente en muestras de pacientes son indicativos de una alteración en el exón de SCN1A y se deben analizar posteriormente en ensayos secundarios como la secuenciación de ADN para identificar la naturaleza de la alteración.

45 Los ensayos electroforéticos adicionales que se pueden emplear incluyen ensayos de protección de ARNasa (Finkelstein et al., 1990; Kinszler et al., 1991) y electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) (Wartell et al., 1990; Sheffield et al., 1989). La protección de ARNasa implica la escisión de un polinucleótido mutante en dos o más fragmentos más pequeños mientras que DGGE detecta diferencias en las velocidades de migración de las secuencias mutantes en comparación con las secuencias silvestres, utilizando un gel con gradiente de desnaturalización.

50 En el ensayo de protección de ARNasa, una ribosonda marcada que es complementaria de la secuencia de codificación del gen SCN1A silvestre humano se hibrida con ARNm o ADN aislado del paciente y posteriormente se digiere con la enzima ARNasa A que es capaz de detectar algunos apareamientos erróneos en una estructura de ARN bicatenario. Si la ARNasa A detecta un error de apareamiento, corta en el sitio del error. Por lo tanto, cuando la preparación de ARN hibridado se separa en una matriz de gel electroforético, si la ARNasa A ha detectado y escindido un error de apareamiento, se observará un producto de ARN más pequeño que el ARN bicatenario de longitud completa para la ribosonda y el ARNm o ADN. La ribosonda no necesita tener la longitud completa del ARNm de SCN1A o del gen, sino que puede ser un segmento de cualquiera de ellos. Si la ribosonda comprende sólo un segmento del ARNm de SCN1A o del gen, será aconsejable utilizar varias de esas sondas para analizar toda la secuencia del ARNm en busca de errores de apareamiento.

En otra realización, se pueden utilizar ensayos enzimáticos (Taylor y Deeble, 1999) en aplicaciones de diagnóstico.

Dichos ensayos incluyen el uso de nucleasa SI, ribonucleasa, endonucleasa T4 VII, MutS (Modrich, 1991), escindasa (cleavase) y MutY. En el ensayo de MutS, la proteína se une sólo a secuencias que contienen un error de apareamiento de nucleótido en un ácido nucleico heterobcatenario entre las secuencias mutante y silvestre.

5 Cuando un ensayo se va a basar en la proteína SCN1A, son posibles una diversidad de métodos. Por ejemplo, se puede lograr el diagnóstico monitoreando las diferencias en la movilidad electroforética de la proteína SCN1A normal y la proteína SCN1A aislada de la muestra de un paciente. Dicho método será particularmente útil para identificar alteraciones en las que están presentes sustituciones de carga, o en las cuales las inserciones, deleciones o sustituciones han producido un cambio significativo en la migración electroforética de la proteína resultante.  
10 Alternativamente, el diagnóstico se puede basar en las diferencias en los patrones de escisión proteolítica de las proteínas normal y alterada, en las diferencias en las relaciones molares de los diversos residuos de aminoácidos, o por ensayos funcionales que demuestran la función alterada de los productos génicos.

15 Otros ensayos que se basan en la proteína SCN1A incluyen los inmunoensayos. No se conocen en la actualidad inmunoensayos para el producto del gen SCN1A. Sin embargo, se incluye el inmunoensayo en la selección de ensayos porque los procedimientos para desarrollar anticuerpos contra productos génicos específicos están bien descritos en la bibliografía, por ejemplo en las patentes de Estados Unidos N° 4,172,124 y 4,474,893. Normalmente se desarrollan anticuerpos que se unen a porciones del producto génico alejadas de los sitios de mutación comunes de modo que el mismo anticuerpo se una tanto a la proteína mutante como a la normal. Los anticuerpos preferidos para utilizar en esta invención son anticuerpos monoclonales debido a su mayor previsibilidad y especificidad. Se apreciará, sin embargo, que se puede usar esencialmente cualquier anticuerpo que posea el alto nivel de especificidad deseado, y que no es necesaria la optimización para alcanzar una alta sensibilidad.

25 Para la detección diagnóstica de alteraciones nuevas en SCN1A relacionadas con la SMEI, serán preferibles los anticuerpos desarrollados contra el extremo carboxi-terminal de la proteína. Para la detección diagnóstica de las alteraciones de SCN1A que se ha identificado previamente que se relacionan con la SMEI, es preferible el anticuerpo desarrollado contra el producto génico defectuoso. Los anticuerpos se agregan a una porción de una muestra del paciente en condiciones en las que se produce una reacción inmunológica, y luego la muestra se evalúa para ver si se produjo dicha reacción. El método específico para llevar a cabo esta evaluación no es crítico y puede incluir enzimoimmunoensayo de adsorción (ELISA), descrito en la patente de Estados Unidos N° 4,016,043, enzimoimmunoensayo fluorescente (FEIA o ELFA), que es similar al ELISA, excepto que se utiliza un sustrato enzimático fluorogénico como 4-metilumbeliferil-beta-galactósido en lugar de un sustrato cromogénico, y radioimmunoensayo (RIA).

35 El ensayo diagnóstico más definitivo que se puede emplear es la secuenciación del ADN y en última instancia, puede ser el único ensayo que se necesite llevar a cabo. La comparación de la secuencia del ADN del SCN1A silvestre con la secuencia de SCN1A de un paciente de prueba proporciona tanto alta especificidad como alta sensibilidad. La metodología general empleada comprende amplificar (por ejemplo con PCR) los fragmentos de ADN de interés del ADN del paciente; combinar el ADN amplificado con un cebador de secuenciación que puede ser igual o diferente de los cebadores de amplificación; extender el cebador de secuenciación en presencia de un nucleótido normal (A, C, G y T) y un nucleótido de terminación de cadena, como un didesoxinucleótido, que evite la extensión posterior del cebador una vez incorporado; y analizar el producto respecto a la longitud de los fragmentos extendidos obtenidos. Si bien dichos métodos, que se basan en el método de didesoxisequenciación original dado a conocer por Sanger et al., 1977 son útiles en la presente invención, el ensayo final no se limita a estos métodos. Por ejemplo, también se pueden emplear otros métodos para determinar la secuencia del gen de interés o de una porción de éste. Los métodos alternativos incluyen los descritos por Maxam y Gilbert (1977) y variaciones del método de didesoxi, y métodos que no dependen en absoluto de nucleótidos de terminación de cadena como el dado a conocer en la patente de Estados Unidos N° 4,971,903. Todas las diferencias de secuencia (excepto los polimorfismos benignos) en los exones de SCN1A de un paciente de prueba cuando se comparan con la secuencia del SCN1A silvestre indican una potencial alteración causante de SMEI.  
50

En otro aspecto de la invención se proporciona un método para el diagnóstico de SMEI en un paciente que comprende los pasos de elegir un sistema de ensayos que comprenda uno o más ensayos para proporcionar una prueba de la existencia de una alteración en SCN1A y uno o más ensayos para proporcionar una prueba para identificar la naturaleza de la alteración, con el fin de determinar la probabilidad de que sea una alteración asociada a la SMEI.  
55

La aplicación de la invención ha llevado a la identificación de una serie de mutaciones en el gen SCN1A en individuos a los que se les ha diagnosticado clínicamente SMEI. Esto demuestra la utilidad del ensayo diagnóstico para proporcionar una probabilidad de que un individuo pueda verse afectado por SMEI.  
60

Se apreciará que habiendo identificado nuevas alteraciones en el gen SCN1A responsable de la epilepsia, incluida la SMEI, las proteínas SCN1A alteradas habilitarán métodos terapéuticos para el tratamiento de la epilepsia, incluida la SMEI.

A lo largo de esta memoria y las reivindicaciones, las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" se utilizan en un sentido no exclusivo, excepto cuando el contexto exija lo contrario.

## 5 Modos de llevar a cabo la invención

Se puede emplear cualquier combinación de los sistemas de ensayo descritos antes para la identificación de las mutaciones de SCN1A potencialmente causantes de la SMEI. A continuación se proporcionan ejemplos de los ensayos que se pueden emplear.

10

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Obtención del ADN del paciente

15 El diagrama de flujo de la figura 1 ilustra una estrategia basada en la invención que se puede usar para determinar la probabilidad de que una alteración en el gen SCN1A sea responsable de la SMEI. La combinación de ensayos elegida es precedida por la selección de la población de pacientes que se va a examinar y la obtención del ADN de la población de muestra. La población de muestra puede abarcar cualquier individuo con epilepsia pero se enfocará probablemente en niños con convulsiones febriles así como en otros pacientes que se sospecha que padecen  
20 epilepsia mioclónica. Para el presente estudio, la población de pacientes elegida incluyó individuos a los que se les había diagnosticado SMEI a partir de un análisis clínico o que habían presentado encefalopatías graves durante los primeros 12 meses de vida.

25 El ADN de un paciente de prueba se puede obtener de numerosas maneras. El método más común es obtener el ADN de muestras de sangre extraídas del paciente, sin embargo el ADN también se puede obtener utilizando métodos menos invasivos como hisopado de células de la mejilla.

30 Para el presente estudio el ADN se extrajo de sangre obtenida utilizando el kit QIAamp DNA Blood Maxi (Qiagen) según las especificaciones del fabricante o mediante procedimientos adaptados del de Wyman y White (1980). Para las muestras de ADN obtenidas usando el kit QIAamp se usó un paso final de precipitación con etanol resuspendiendo los gránulos de ADN en agua estéril. La reserva de muestras de ADN se mantuvo a una concentración de 200 ng/μl y se prepararon diluciones de 100 ng/μl para posteriores reacciones de PCR.

#### 35 Ejemplo 2: Ensayo de dHPLC

Una vez que se obtuvo el ADN de los pacientes, se empleó amplificación por PCR de los exones individuales del gen SCN1A antes del análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (dHPLC). El gen SCN1A tiene 26 exones para los cuales se diseñaron cebadores a fin de amplificar 33 amplicones. Cada exón se amplificó mediante un solo amplicón con excepción de los exones 11, 15 y 16 que se amplificaron en dos amplicones respectivamente y el exón  
40 26 en que se usaron 5 amplicones para amplificar el exón entero. La tabla 1 proporciona una lista de cebadores que fueron diseñados para analizar cada exón del gen SCN1A.

45 Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un volumen de 20 μl y se prepararon en placas de 96 pocillos. Para la mayoría de los amplicones la reacción de PCR consistió en tampón de PCR 1X (Invitrogen), dNTP 200 μM, 300 ng de cada cebador, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 100 ng de ADN y 0.5 unidades de ADN polimerasa Taq (Invitrogen). Las condiciones anteriores se utilizaron para todos los amplicones excepto para los exones 5 y 26(1) donde se utilizó 1 unidad de ADN polimerasa Taq.

50 Las condiciones de ciclado térmico empleadas para la amplificación por PCR variaron según cada exón. Para los exones 1-4, 6-9, 11(1), 11(2), 12, 14, 15(1), 15(2), 16(2), 19 y 22-24, las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando 1 ciclo de 94 °C durante 2 minutos, seguido de 10 ciclos de 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos y 94 °C durante 30 segundos, seguido de 25 ciclos de 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos y 94 °C durante 30 segundos. Una reacción de hibridación final a 55 °C durante 30 segundos seguida de una reacción de extensión durante 10 minutos a 72 °C completó las condiciones de ciclado para estos amplicones.

55 Para el exón 5, se emplearon las mismas condiciones que antes, excepto que la temperatura de hibridación fue de 62 °C durante 10 ciclos y después de 58 °C durante 25 ciclos.

60 Para los exones 10, 16(1), 21, 25, 26(1), 26(2), 26(3), 26(4) y 26(5), las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando 1 ciclo de 94 °C durante 2 minutos, seguido de 10 ciclos de 60 °C durante 1.5 minutos, 72 °C durante 1.5 minutos y 94 °C durante 1.5 minutos, seguido de 25 ciclos de 55 °C durante 1.5 minutos, 72 °C durante 1.5 minutos y 94 °C durante 1.5 minutos. Una reacción de hibridación final a 55 °C durante 1.5 minutos seguida de una reacción de extensión durante 10 minutos a 72 °C completó las condiciones de ciclado para estos amplicones.

Para los exones 17, 18 y 20, las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando 1 ciclo de 94 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 50 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos y 94 °C durante 30 segundos. Una reacción de hibridación final a 50 °C durante 30 segundos seguida de una reacción de extensión durante 10 minutos a 72 °C completó las condiciones de ciclado para estos amplicones.

Para el exón 13, las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando 1 ciclo de 94 °C durante 2 minutos, seguido de 10 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 64 °C durante 1.5 minutos y 72 °C durante 1.5 minutos, seguido de 25 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 60 °C durante 1.5 minutos y 72 °C durante 1.5 minutos. Esto fue seguido de una reacción de extensión final durante 10 minutos a 72 °C para completar las condiciones de ciclado para este amplicón.

Antes del análisis de dHPLC, los productos de PCR se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y después se enfriaron lentamente a incrementos de -3 °C durante 1.5 minutos (hasta que se alcanzaron los 25 °C). Esto es para permitir la formación de ácidos nucleicos hetero y homobicatenarios dependiendo de la constitución de nucleótidos del producto de PCR.

Se pueden utilizar diversos sistemas de dHPLC para el análisis de ácidos nucleicos heterobicatenarios y la detección de mutaciones. Este estudio utilizó el sistema Transgenomic WAVE<sup>®</sup> y la metodología provista con el sistema. Con el fin de detectar mutaciones en el dHPLC cada producto debía correrse en condiciones parcialmente desnaturizantes. Debido a que cada amplicón del gen SCN1A tiene una secuencia diferente, fue necesario calcular la temperatura o las temperaturas a las cuales cada producto se desnaturiza parcialmente. Empleando el software Transgenomic suministrado con el sistema dHPLC se determinaron las temperaturas necesarias para cada uno de los amplicones y se muestran en la tabla 2.

Los amplicones se introducen a través de la columna de dHPLC según las condiciones de los fabricantes y se comparan los cromatogramas generados por computadora de las muestras de pacientes con las muestras silvestres. El análisis se realiza visualmente observando los cromatogramas y también utilizando el software Transgenomic de detección de la mutación provisto con el HPLC. Las muestras de los pacientes que mostraban patrones de picos diferentes del correspondiente al tipo silvestre se considera que contienen alteraciones en el amplicón de SCN1A en investigación, y el ADN de esos individuos fue objeto de un ensayo adicional, a saber: secuenciación de ADN (véase ejemplo 3 más adelante), para determinar la naturaleza de la alteración de SCN1A y para predecir la probabilidad de que la alteración sea responsable de la SMEI.

#### Ejemplo 3: Ensayo de secuenciación de ADN

Los productos de PCR del análisis de dHPLC que mostraron patrones de picos diferentes respecto al silvestre se pueden someter a ensayos secundarios como la secuenciación de ADN, para identificar la naturaleza de la alteración. En el presente estudio se empleó la secuenciación de ADN. Este primer ensayo implicó la reamplificación del amplicón que presenta un cromatograma de dHPLC alterado del individuo pertinente seguido de la purificación de las plantillas de PCR amplificadas para la secuenciación utilizando preparaciones QiaQuick PCR (Qiagen) basándose en los procedimientos de los fabricantes. Los cebadores utilizados para secuenciar los amplicones purificados fueron idénticos a los utilizados para el paso de amplificación inicial. Para cada reacción de secuenciación se utilizaron 25 ng de cebador y 100 ng de plantilla de PCR purificada. Para todas las reacciones de secuenciación se utilizó el kit de secuenciación BigDye (ABI) según las especificaciones del fabricante. Los productos se corrieron en un secuenciador ABI 377 y se analizaron utilizando el programa EditView.

Luego se realizó una comparación de la secuencia de ADN obtenida de la muestra del paciente directamente con la secuencia de SCN1A silvestre para identificar la naturaleza de la alteración del ADN que conduce al cambio detectado por dHPLC.

En la tabla 3 se muestran los resultados del cribado de 26 de los 33 amplicones del gen SCN1A. Se analizaron un total de 96 pacientes con su fenotipo clínico de epilepsia oculto durante el análisis. Un total de 34 muestras demostraron que tenían una alteración en el gen SCN1A y de éstas, 28 muestras tenían un claro fenotipo de SMEI basándose en un análisis clínico. Cuatro de las alteraciones de SCN1A (M1780T, R222X, R1407X, R1892X) que fueron identificadas no se muestran en la tabla 3 porque habían sido asociadas previamente a la SMEI (Nabbout et al., 2003; Claes et al., 2001; Sugawara et al., 2002). Por lo tanto, se puede determinar que si se encuentra una alteración de SCN1A en un paciente, entonces el paciente tiene un 82% de probabilidad (28/34) de sufrir de SMEI.

Esta probabilidad aumentaría si la alteración identificada fuera una que hubiera sido previamente asociada a la SMEI. Además, basándose en la opinión actual (Mulley et al., 2003) la probabilidad aumentaría aún más si la alteración no se ve en los padres ni familiares de la persona afectada (es decir, es una alteración *de novo*) e incrementa aún más si se encuentra que la alteración da lugar a una interrupción importante en la proteína (por ejemplo, una alteración de truncamiento). La capacidad para proporcionar este nivel de certeza como un diagnóstico de SMEI será beneficiosa cuando se consideren regímenes de tratamiento para el paciente y la capacidad de evitar el agravamiento de las convulsiones inducidas por factores como fiebre asociada a vacunaciones y otras causas.



Ejemplo 4: Ensayos adicionales - Ensayo SSCP

5 Además de los ensayos descritos antes, se pueden emplear otros ensayos para determinar la existencia de alteraciones en el gen SCN1A que están asociadas a la SMEI. Uno de dichos ensayos es un análisis de polimorfismo conformacional de una sola hebra (SSCP). En esta técnica, el ADN obtenido del paciente se amplifica primero por PCR para los exones individuales del gen SCN1A. Los cebadores empleados para el análisis dHPLC (véase Tabla 1) también se pueden emplear para el análisis SSCP.

10 En algunos casos los cebadores utilizados para el análisis SSCP se marcan en su extremo 5' con HEX para un método de detección basado en fluorescencia como el utilizado por ejemplo en el sistema GelScan 2000 (Corbett Research, Australia). Las reacciones SSCP PCR y las condiciones de ciclado se pueden llevar a cabo como se describe antes para el análisis dHPLC, sin embargo se pueden usar todas las reacciones de PCR y condiciones de ciclado siempre que la amplificación produzca un producto definido específico únicamente para el amplicón que se está investigando.

15 Un ejemplo de condiciones de reacción de PCR alternativas es cuando la reacción se lleva a cabo en un volumen total de 10 µl que contiene Tris-HCl 67 mM (pH 8.8); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16.5 mM; EDTA 6.5 µM; MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM; cada dNTP 200 µM; DMSO al 10%; 0.17 mg/ml de BSA; β-mercaptoetanol 10 mM; 5 µg/ml de cada cebador y 100 U/ml de ADN polimerasa *Taq*. Para las condiciones de ciclado la PCR puede usar 10 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos seguido de 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Seguiría una reacción de extensión final durante 10 minutos a 72 °C.

25 Veinte µl de tintura de carga con 50% (v/v) de formamida, EDTA 12.5 mM y azul de bromofenol al 0.02% (p/v) se agregan después a las reacciones completadas que luego se corren en geles de poliacrilamida al 4% no desnaturalizantes con una relación de reticulación de 35:1 (acrilamida:bisacrilamida) y que contienen 2% de glicerol. Para el análisis de amplicones por PCR utilizando el sistema GelScan 2000, el espesor del gel empleado corrientemente es de 100 µm, con un ancho de 168 mm y una longitud de 160 mm. Los geles se corren normalmente a 1200 volt y aproximadamente 20 mA, a 22 °C, y se analizan en el sistema GelScan 2000 según las especificaciones del fabricante. Los amplicones que contienen alteraciones en la secuencia de SCN1A migrarán a través del gel de manera diferente que los amplicones del tipo silvestre debido su conformación de una sola hebra alterada. Luego se puede emplear otro ensayo como secuenciación de ADN (véase el ejemplo 3 antes) para determinar la naturaleza de la alteración de SCN1A en el amplicón.

35 TABLA 1

Secuencias de cebadores utilizados para el análisis del ensayo de dHPLC de SCN1A			
Exón	Cebador hacia delante	Cebador reverso	Tamaño (bp)
1	CCTCTAGCTCATGTTTCATGAC	TGCAGTAGGCAATTAGCAGC	448
2	CTAATTAAGAAGAGATCCAGTGACAG	GCTATAAAGTGCTTACAGATCATGTAC	356
3	CCCTGAATTTTGGCTAAGCTGCAG	CTACATTAAGACACAGTTTCAAATCC	263
4	GGGCTACGTTTCATTTGTATG	GCAACCTATTCTTAAAGCATAAGACTG	358
5	AGGCTCTTTGTACCTACAGC	CATGTAGGGTCCGTCTCATT	200
6	CACACGTGTTAAGTCTTCATAGT	AGCCCCTCAAGTATTTATCCT	394
7	GAACCTGACCTTCCTGTTCTC	GTTGGCTGTTATCTTCAGTTTC	241
8	AAAGGCAGCAGAACGACTTG	GGATAGAGGAACTCAAGTCTC	322
9	TTGAAAGTTGAAGCCACCAC	CCACCTGCTCTTAGGTACTION	363
10	GCCATGCAAATACTTCAGCCC	CACAACAGTGGTTGATTGATTG	480
11(1)	TGAATGCTGAAATCTCCTTCTAC	CTCAGGTTGCTGTTGCGTCTC	306
11(2)	GATAACGAGAGCCGTAGAGAT	TCTGTAGAAACACTGGCTGG	315
12	CATGAAATTCACCTGTGTCACC	CAGCTCTTGAATTAGACTGTC	347
13	ATCCTTGGGAGGTTTAGAGT	GCATGAAGGATGGTTGAAAG	510
14	CATTGTGGGAAAATAGCATAAGC	GCTATGCAGAACCCTGATTG	339

ES 2 478 624 T3

Secuencias de cebadores utilizados para el análisis del ensayo de dHPLC de SCN1A			
Exón	Cebador hacia delante	Cebador reverso	Tamaño (bp)
15(1)	TGAGACGGTTAGGGCAGATC	AGAAGTCATTCATGTGCCAGG	348
15(2)	GTCTTGCCATCATCGTCTTC	ACATGTGCACAATGTGCAGG	350
16(1)	GTGGTGTTTCCTTCTCATCAAG	CACTGCTGCCAGTTCCTATAC	458
16(2)	CAACAGTCCTTCATTAGGAAAC	ACCTTCCCACACCTATAGAATC	353
17	CTTGGCAGGCAACTTATTACC	CAAGCTGCACTCCAAATGAAAG	232
18	TGGAAGCAGAGACACTTTATCTAC	GTGCTGTATCACCTTTTCTTAATC	234
19	CCTATTCCAATGAAATGTCATATG	CAAGCTACCTTGAACAGAGAC	318
20	CTACACATTGAATGATGATTCTGT	GCTATATAACAATACTTCAGGTTCT	216
21	ACCAGAGATTACTAGGGGAAT	CTGGGCTCATAAAGTGTACTAAC	513
22	ACTGTCTTGGTCCAAAATCTG	TTCGATTAATTTTACCACCTGATC	267
23	AGCACCAGTGACATTTCCAAC	GGCAGAGAAAACACTCCAAGG	271
24	GACACAGTTTTAACAGTTTG	TGTGAGACAAGCATGCAAGTT	207
25	CAGGGCCAATGACTACTTTGC	CTGATTGCTGGGATGATCTTGAATC	477
26(1)	CAGGACTCTGAACCTTACCTTG	ATTCCAACAGATGGGTTCCCA	534
26(2)	TCCTGCGTTGTTTAAACATCGG	AGCGCAGCTGCAAAGTGAAGAT	504
26(3)	TGGAAGCTCAGTTAAGGGAGA	GTAGTGATTGGCTGATAGGAG	480
26(4)	CCGATGCAACTCAGTTCATGGA	TGCCCTTCTTGCTCATGTTTTTCCACA	555
26(5)	AGAGCGATTCATGGCTTCCAATCC	TGCTGACAAGGGGTCCTGCTCT	526

*Nota:* Las secuencias de los cebadores se indican en el sentido 5' a 3'. Debido al gran tamaño de los exones 11, 15, 16 y 26, los exones se dividen en dos o más amplicones superpuestos.

TABLA 2

Condiciones de desnaturalización parcial para el análisis del ensayo de dHPLC de los amplicones de SCN1A

Exón	Temp 1	Temp 2	Temp 3	Exon	Temp 1	Temp 2	Temp 3
1	53.0	55.2	58.8	16 (1)	54.9	55.6	57.3
2	53.5	55.2	58.0	16(2)	56.1	-	-
3	55.9	-	-	17	57.6	60.4	-
4	54.5	55.5	56.5	18	58.5	-	-
5	60.2	-	-	19	53.0	56.5	-
6	53.8	57.5	58.9	20	58.5	-	-
7	56.3	-	-	21	55.2	56.7	-
8	57.9	-	-	22	55.5	-	-
9	56.7	60.1	-	23	55.6	56.3	-
10	56.0	58.5	61.0	24	55.6	56.7	-
11(1)	57.1	60.2	61.5	25	53.8	55.6	56.8
11(2)	58.8	61.2	62.3	26(1)	55.8	59.0	60.0
12	55.3	57.3	-	26(2)	58.5	-	-
13	53.8	55.2	56.4	26(3)	58.5	59.8	-
14	55.4	57.9	-	26(4)	55.5	57.0	57.9

ES 2 478 624 T3

Condiciones de desnaturalización parcial para el análisis del ensayo de dHPLC de los amplicones de SCN1A							
Exón	Temp 1	Temp 2	Temp 3	Exon	Temp 1	Temp 2	Temp 3
15(1)	57.5	60.2	-	26(5)	55.1	56.6	-
15(2)	58.4	60.7	-				

*Nota:* Todas las temperaturas son en grados Celsius. Temp 1 Temp 2 y Temp 3 representan las temperaturas a las cuales diferentes regiones del amplicón se desnaturalizan durante el análisis de dHPLC. Algunos amplicones requirieron 3 temperaturas parcialmente desnaturalizantes para el análisis completo del amplicón en tanto otros amplicones requirieron dos o menos temperaturas.

TABLA 3

Alteraciones nuevas identificadas en SCN1A						
Diagnóstico del paciente <sup>1</sup>	Tipo de mutación	Cambio de nucleótido <sup>2</sup>	Cambio de aminoácido <sup>2</sup>	Números de SEC. ID	de	
SMEI	Sentido erróneo	c251A→G	Y84C	1, 26		
SMEI	Sentido erróneo	c301C→T	R101W	2, 27		
SMEI	Sentido erróneo	c512T→A	I171K	3, 28		
SMEI	Sentido erróneo	c596C→G	T199R	4, 29		
SMEI <sup>4</sup>	Sentido erróneo	c677C→T	T226M	5, 30		
SMEI	Sentido erróneo	c715G→A	A239T	6, 31		
SMEI	Sentido erróneo	c2837G→A	R946H	7, 32		
SMEI	Sentido erróneo	c3714A→C	E1238D	8, 33		
SMEI	Sentido erróneo	c4186T→G	C1396G	9, 34		
SMEI	Sentido erróneo	c4321G→C	A1441P	10, 35		
SMEI	Sentido erróneo	c4633A→G	I1545V	11, 36		
SMEI	Sentido erróneo	c4934G→A	R1645Q	12, 37		
SMEI	Sentido erróneo	c5119T→G	F1707V	13, 38		
SMEI	Sentido erróneo	c5347G→A	A1783T	14, 39		
SMEI	Truncamiento	c41delT	F14fsX91	15, 40		
SMEI	Truncamiento	c496insGTGAATC	T166fsX170	16, 41		
SMEI	Truncamiento	c1687delC	L563fsX622	17, 42		
SMEI	Truncamiento	c3231delA	K1077fsX1079	18, 43		
SMEI	Truncamiento	c3561-3562delAA	Q1187fsX1215	19, 44		
SMEI	Truncamiento	c4062delT	C1354fsX1359	20, 45		
SMEI	Truncamiento	c4526delA	N1509fsX1511	21, 46		
SMEI	Sin sentido	c3022G→T	E1008X	22, 47		
SMEI	Sin sentido	c4279C→T	Q1427X	23, 48		
SMEI <sup>3</sup>	Sitio de empalme	IVS4+5G→A	-	24		
SMEI <sup>3</sup>	Sitio de empalme	IVS3-13T→A	-	25		
No SMEI	Sentido erróneo	c580G→A	D194N	49, 54		
No SMEI	Sentido erróneo	c4439G→T	G1480V	50, 55		
No SMEI	Sentido erróneo	c4907G→A	R1636Q	51, 56		
No SMEI	Truncamiento	c1724de1T	F575fsX622	52, 57		

## ES 2 478 624 T3

Alteraciones nuevas identificadas en SCN1A					
Diagnóstico del paciente <sup>1</sup>	Tipo de mutación	Cambio de nucleótido <sup>2</sup>	Cambio de aminoácido <sup>2</sup>	Números de SEC. ID	de
No SMEI	Truncamiento	c5741-5742delAA	Q1914fsX1943	53, 58	

*Nota:* <sup>1</sup> El diagnóstico del paciente se basó en las observaciones clínicas iniciales. La numeración se basa en la isoforma más grande de SCN1A. <sup>3</sup> Estas alteraciones en el sitio de empalme se observaron en el mismo individuo. <sup>4</sup> Esta alteración también se observó en un individuo al que no se le había diagnosticado clínicamente SMEI.

## Referencias

Las referencias citadas en este documento se enumeran en las siguientes páginas,

- 5 Annegers, JF. (1996). *The treatment of epilepsy: Principles and practice*. Second Edition. (Wyllie E (Ed) Williams and Wilkins).
- Berkovic, SF. et al. (1987). *Neurology* 37: 993-1000.
- Berkovic, SF. et al. (1994). In: *Epileptic seizures and syndromes*. Wolf, P. (Editor). London: John Libbey. 25-37.
- Bourgeois, BFD. (2003). *Epilepsia* 44(s2): 27-31.
- Breaker, RR. and Joyce, GF. (1995). *Chem. Biol.* 2: 655-600.
- 10 Claes, L. et al. (2001). *Am. J. Hum. Genet.* 68: 1327-1332.
- Cole, SP. et al. (1984). *Mol. Cell Biochem.* 62: 109-120.
- Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy. (1989). *Epilepsia* 30: 389-399.
- Cote, RJ. et al. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030.
- 15 Escayg, A. et al. (2000). *Nature Genet.* 24: 343-345.
- Finkelstein, J. et al. (1990). *Genomics* 7: 167-172.
- Gardiner, M. (2000). *J Neurol.* 247: 327-334.
- Goldman, CK. et al. (1997). *Nature Biotechnology* 15: 462-466.
- Gonzalez, JE. et al. (1999). *Drug Discov. Today* 4: 431-439.
- 20 Hamill, OP. et al. (1981). *Pflugers Arch.* 391: 85-100.
- Haseloff, J. and Gerlach, WL. (1988). *Nature* 334: 585-591.
- Heller, RA. et al. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2150-2155.
- Huse, WD. et al. (1989). *Science* 246: 1275-1281.
- Kinszler, KW. et al. (1991). *Science* 251: 1366-1370.
- 25 Kohler, G. and Milstein, C. (1975). *Nature* 256: 495-497.
- Kozbor, D. et al. (1985). *J. Immunol. Methods* 81:31-42.
- Maxam, AM. and Gilbert, W. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 560-564.
- Modrich, P. (1991). *Ann. Rev. Genet.* 25: 229-253.
- Mulley, JC. et al. (2003). *Curr. Opin. Neurol.* 16: 171-176.
- 30 Nabbut, R. et al. (2003). *Neurology* 60: 1961-1967.
- Ohmori, I. et al. (2002). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295: 17-23.
- Orita, M. et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2766-2770.
- Orlandi, R. et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3833-3837.
- Reutens, DC. and Berkovic, SF. (1995). *Neurology* 45: 1469-1476.
- 35 Rickert, RC. et al. (1997). *Nucleic Acids Res.* 25: 1317-1318.
- Roger, J. et al. (1992). *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*. 2nd Edition. London, John Libbey.
- Sanger, F. et al. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Scharf, KD. et al. (1994). *Results Probl. Cell Differ.* 20: 125-162.
- 40 Scheffer, IE. and Berkovic, SF. (1997). *Brain* 120: 479-90.
- Scheffer, IE. and Berkovic, SF. (2003). *Trends Pharmac. Sci.* 24: 428-433.
- Schena, M. et al. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10614-10619.
- Schwenk, F. et al. (1995). *Nucleic Acids Res.* 23: 5080-5081.
- Sheffield, VC. et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 232-236.
- 45 Singh, R. et al. (1999). *Ann. Neurol.* 45: 75-81.
- Singh, R. et al. (2001). *Epilepsia* 42: 837-844.
- Sugawara, T. et al. (2002). *Neurology* 58: 1122-1124.
- Sutton, GC. (1990). *The principles and practice of medical genetics*. Second Edition. (Churchill Livingstone, NY).
- 50 Taylor, GR. and Deeble, J. (1999). *Gen. Anal. Biomolec. Engin.* 14: 181-186.
- Veggiotti, P. et al. (2001). *Epileptic. Disord.* 3: 29-32.
- Wallace, et al. (1998). *Nature Genet.* 19: 366-370.
- Wartell, RM. et al. (1990). *Nucleic Acids Res.* 18: 2699-2705.
- Winter, G. and Milstein, C. (1991). *Nature* 349: 293-299.
- 55 Wyman, AR. and White, R. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 6754-6758.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para diagnosticar predictivamente la probabilidad de que un paciente sufra de SMEI que comprende:

- 5 (i) secuenciar el gen SC1NA de un paciente con el fin de detectar una mutación en el gen SCN1A del paciente, incluida en una región reguladora del gen, en una muestra del paciente;
- (ii) determinar si la mutación ha sido detectada previamente, o no, en el gen SCN1A de los sujetos y se sabe que está asociada a la SMEI, o no ha sido asociada previamente a la SMEI, donde, cuando la mutación identificada no ha sido asociada previamente a la SMEI, los padres o familiares del paciente también se someten a análisis para determinar si la mutación del paciente ha surgido *de novo*.
- 10

donde dicho diagnóstico predictivo de riesgo de SMEI es de la manera siguiente:

- 15 (a) si la mutación ha sido asociada previamente a la SMEI, entonces se prevé una alta probabilidad de riesgo de SMEI;
- (b) si la mutación es conocida y no ha sido asociada previamente a la SMEI, entonces se prevé una baja probabilidad de riesgo de SMEI; y
- (c) si la mutación no ha sido identificada previamente y se ha demostrado que ha surgido *de novo*, existe una alta probabilidad de riesgo de SMEI y un riesgo aún mayor si la mutación se identifica como una mutación de truncamiento.
- 20

2. El método reivindicado en la reivindicación 1 donde la mutación es una mutación identificada en la tabla 3.

3. Un método como el reivindicado en la reivindicación 1 donde la muestra de ADN que se va a analizar se amplifica cuantitativamente para al menos un exón del gen SCN1A a fin de producir fragmentos amplificados y la longitud de los productos de amplificación para cada exón amplificado se compara con la longitud de los productos de amplificación obtenidos cuando se amplifica un gen SCN1A silvestre utilizando los mismos cebadores, en virtud de lo cual diferencias en la longitud entre exón de la muestra amplificado y el exón silvestre amplificado correspondiente, reflejan que se produjo una alteración de truncamiento en el gen SCN1A de la muestra.

25

30

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el paciente es un paciente epiléptico.

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para auxiliar a una estrategia de tratamiento correcta para el paciente.

35

Figura 1

