



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 266 463**

(51) Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02712954 .3**

(86) Fecha de presentación : **21.03.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1390531**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

(54) Título: **Análisis diagnóstico cuantitativo de la hipertensión.**

(30) Prioridad: **21.03.2001 DE 101 13 876**

(73) Titular/es: **Florian Lang**  
**Im Rotbad 52**  
**72076 Tübingen, DE**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2007**

(72) Inventor/es: **Lang, Florian;**  
**Busjahn, Andreas y**  
**Luft, Friedrich, C.**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2007**

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 266 463 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

Análisis diagnóstico cuantitativo de la hipertensión.

5 La presente invención se refiere a la detección de una relación directa entre dos polimorfismos diferentes de nucleótidos individuales (single nucleotide polymorphisms = SNP) en el gen hsgk1 y a la predisposición condicionada genéticamente a la hipertensión.

10 Numerosas señales extracelulares conducen a la cascada de fosforilación/desfosforilación intracelular para garantizar una transferencia rápida de estas señales desde la membrana plasmática y sus receptores hasta el citoplasma y el núcleo celular. La especificidad de estas cascadas de transducción de señal reversibles se hace posible mediante un gran número de proteínas individuales, especialmente de cinasas, que transmiten un grupo fosfato a sustratos individuales.

15 La cinasa dependiente de suero y glucocorticoide (sgk), una serina/treonina cinasa, cuya expresión se intensifica mediante suero y glucocorticoide, se clonó en primer lugar a partir de las células de carcinoma de mama de las ratas (Webster *et al.*, 1993). La versión humana de la sgk, la hsgk1, se clonó a partir de células de hígado (Waldegger *et al.*, 1997). Se demostró, que se influye la expresión de la hsgk1 mediante la regulación del volumen celular. Para la expresión de la sgk de las ratas no ha podido detectarse hasta ahora una dependencia del volumen celular de este tipo. Además se obtuvo que la cinasa de las ratas estimula el canal de Na<sup>+</sup> epitelial (ENaC) (Chen *et al.*, 1999; Naray-Pejes 20 Toth *et al.*, 1999). El ENaC desempeña a su vez un papel decisivo en la eliminación renal de Na<sup>+</sup>. Un aumento de la actividad del ENaC conduce a una retención renal reforzada de iones de sodio, y de esta manera a un desarrollo de la hipertensión.

25 Finalmente se clonaron dos miembros adicionales de la familia génica del sgk humano, el hsgk2 y hsgk3 (Kobayashi *et al.*, 1999), que ambos (tal como también el hsgk1) se activan mediante insulina e IGF1 a través de la ruta de cinasa PI3. Los experimentos electrofisiológicos mostraron que una coexpresión del hsgk2 y hsgk3 igualmente tienen como consecuencia un incremento significativo de la actividad del ENaC.

30 A partir del documento DE 197 08 173 A1 se deduce, que el hsgk1 en varias enfermedades, en las que modificaciones del volumen celular desempeñan un papel patofisiológico decisivo, tales como por ejemplo hipernatremia, hiponatremia, diabetes mellitus, insuficiencia renal, hipercatabolismo, encefalopatía hepática e infecciones virales o microbianas, posee un potencial diagnóstico considerable.

35 En el documento WO 00/62781 se describió ya, que el hsgk1 activa el canal de Na<sup>+</sup> endotelial, mediante lo cual se aumenta la reabsorción renal de Na<sup>+</sup>. Dado que este aumento de la reabsorción renal de Na<sup>+</sup> va acompañado de hipertensión, se supone aquí que un aumento de la expresión del hsgk1 debe conducir a la hipertensión, una expresión reducida del hsgk1 finalmente a la hipotensión.

40 También en la solicitud alemana de prioridad más antigua no publicada anteriormente con el título "sgk2 und sgk3 als diagnostische und therapeutische Targets" (denominación interna A 35 048) del 28.08.00 se describió una relación similar entre la sobreexpresión o sobreactividad de los homólogos humanos hsgk2 y hsgk3 con la sobreactividad del ENaC, de la reabsorción renal de Na<sup>+</sup> reforzada que resulta de la misma y de la hipertensión que se desarrolla a partir de la misma. Además se discutió ya el potencial diagnóstico de las cinasas hsgk2 y hsgk3 con respecto a la hipertensión arterial.

45 Por un homólogo humano de la familia sgk, que comprende una modificación molecular funcional en el sentido anteriormente citado, se entiende en este contexto un homólogo de la familia sgk, que está mutado de tal manera, que se modifican las propiedades, especialmente las propiedades catalíticas o también la especificidad del sustrato de la proteína correspondiente.

50 El objetivo planteado se soluciona especialmente porque en el marco de la presente invención se identificaron dos SNP diferentes en el gen hsgk1, que (cuando se encuentran en una versión determinada en el gen hsgk1), crean en el paciente una clara propensión a la hipertensión. Por consiguiente la existencia de SNP de este tipo en el gen hsgk1 o también en los homólogos humanos restantes de la familia génica sgk, puede detectarse como indicio diagnóstico de una predisposición condicionada genéticamente para la formación de una hipertensión en muestras corporales del paciente.

55 Por ejemplo, en un kit diagnóstico pueden prepararse especialmente aquellos anticuerpos, que se dirigen de manera específica hacia tales regiones de la proteína hsgk1, las cuales comprenden un fragmento de proteína hsgk1 mutada en el gen hsgk1 correspondiente a un SNP específico. Sin embargo el kit puede contener también anticuerpos contra los alelos más comunes del gen hsgk1 o de los homólogos humanos restantes de la familia sgk, con los que puede determinarse cuantitativamente un nivel de expresión modificado de estos homólogos o de la hsgk1.

60 Además en un kit diagnóstico de este tipo están contenidos preferiblemente aquellos polinucleótidos, que comprenden específicamente regiones que contienen una u otra versión de un SNP relevante de la hipertensión en el gen hsgk1 y de tal modo son adecuados para la determinación de los SNP específicos en el gen hsgk1 del paciente mediante la hibridación en condiciones rigurosas con ARNm, ADNc o ADN genómico de muestras corporales.

## ES 2 266 463 T3

En el caso de pacientes individuales pueden aparecer mutaciones individuales en los genes hsgk1, hsgk2 o hsgk3 que modifican las expresiones elevadas o las propiedades funcionales de las cinasas hsgk1, hsgk2 o hsgk3, y así conducen a una tendencia originada genéticamente a la hipertensión. Las mutaciones de este tipo pueden aparecer por ejemplo en las regiones génicas reguladoras o también en las secuencias de intrón del locus génico sgk y por tanto originar una sobreexpresión de las cinasas correspondientes y una sobreactividad del ENaC. Por otra parte también pueden afectar las diferencias individuales en la dotación genética del locus sgk a la región génica codificante. Entonces dado el caso las mutaciones en la región codificante pueden conducir a una modificación funcional de las cinasas correspondientes, así por ejemplo a las propiedades catalíticas modificadas de las cinasas. Según esto ambas mutaciones descritas anteriormente pueden provocar una activación reforzada del ENaC y por tanto finalmente la formación de una forma de hipertensión condicionada genéticamente en el paciente.

Las mutaciones de este tipo en los homólogos humanos de la familia sgk, que provocan la formación de una forma de hipertensión condicionada genéticamente en el paciente, son por regla general los denominados “polimorfismos de un solo nucleótido” (SNP) o bien en la región del exón o en la región del intrón de estos homólogos. Los SNP en la 15 región del exón de los genes hsgk pueden conducir en su versión que aparece con menos frecuencia (denominada en lo sucesivo versión mutada) dado el caso a intercambios de aminoácidos en la proteína hsgk correspondiente y por consiguiente a una modificación funcional de las cinasas. Los SNP en la región del intrón o en secuencias reguladoras de los genes hsgk pueden conducir en su versión mutada dado el caso a un nivel de expresión modificado de las cinasas correspondientes.

En el marco de la presente invención se realizó un estudio de correlación, en el que el genotipo del gen hsgk1 de diferentes pacientes (gemelos) se comparó con los valores de tensión arterial sistólicos y diastólicos medidos, que se midieron en diferentes posiciones corporales respectivamente (sentada, de pie, tumbada), y se evaluaron estadísticamente.

Así pudo mostrarse en el marco de la presente invención, que la presencia de un intercambio (C → T) en el exón 8 (1<sup>er</sup> SNP, véase la SEQ ID NO. 1) en ambos alelos (portador TT homocigótico del SNP en el exón 8), que no conduce a un intercambio de aminoácidos a nivel de proteína (véase la SEQ ID NO.2), conduce a valores de tensión arterial significativamente más altos y por consiguiente a una tendencia condicionada genéticamente a la hipertensión (tabla 3).

Además pudo mostrarse, que la presencia de un intercambio (T → C) (2º SNP), que se localiza 551 pb alejado del 1<sup>er</sup> SNP en el sitio donador-de empalme en el paso del intrón 6 al exón 7, en su realización homocigótica conduce a valores de tensión arterial inferiores y por consiguiente a una tendencia condicionada genéticamente inferior a la hipertensión (tabla 3).

Dado que ambos SNP según la invención en el gen hsgk1 no conducen a intercambios de aminoácidos a nivel de proteína, se basará, la predisposición genética condicionada por la misma, marcada más o menos intensamente, a la hipertensión, probablemente en un nivel de expresión modificado del gen hsgk1.

El primer SNP en el exón 8 (C → T) se explica con más detalle adicionalmente mediante la figura 1. En la figura 1 se representan los exones individuales del gen hsgk1 y se describen en cada caso mediante el número de exón, el ID de exón, la cadena y el “recuento de secuencias” (“Sequenz-Conting”) pertenecientes al mismo, así como también el inicio, extremo terminal y longitud de los exones. La posición exacta del intercambio (C → T) en el 40 marco del SNP en el exón 8 se indica por la C marcada en oscuro en el exón 8. La marca más clara en el exón 8 en la figura 1 indica la secuencia que flanquea al SNP en el gen hsgk1, que determina claramente la posición en el genoma.

El segundo SNP (T → C) en el intrón 6 se identificó mediante secuenciación directa, y se caracteriza claramente 50 por que se localiza en el gen hsgk1 (que comprende exones e intrones) exactamente a 551 pb del primer SNP en el exón 8 aguas arriba en el sitio donador-de empalme del intrón 6 al exón 7 del gen hsgk1 y afecta al intercambio de una T por una C.

Además pudo mostrarse que los valores de tensión arterial sistólicos y diastólicos medidos en diferentes posiciones 55 corporales muestran todas en la misma medida una dependencia del genotipo del gen hsgk1 (tabla 4). Por consiguiente a partir de la tabla 4 es evidente que de hecho son relevantes estadísticamente las correlaciones encontradas entre la tensión arterial medida de los pacientes y la aparición de los polimorfismos mencionados anteriormente (SNP) en sus genes hsgk1.

Además muestran los dos SNP analizados en el gen hsgk1 un gran desequilibrio en la frecuencia de sus apariciones 60 correlacionadas (tabla 5). Mientras que la mayoría de los portadores de CC del SNP en el exón 8 son también los portadores de TT del SNP en el intrón 6 (el 64%), no se da el caso contrario (solo el 2% de los portadores de TT del exón 8 son también portadores de CC del intrón 6).

La correlación determinada en primer lugar entre la tensión arterial del paciente y su versión genética individual 65 del locus génico hsgk1 muestra que los polinucleótidos o anticuerpos específicos, que se dirigen hacia hsgk1, son adecuados para la diagnosis de una tendencia condicionada genéticamente especial a la hipertensión. Esta forma especial de la hipertensión originada genéticamente puede caracterizarse mediante un aumento de la expresión del

## ES 2 266 463 T3

hsgk1, o sea mediante una sobreexpresión o dado el caso también mediante propiedades funcionales modificadas del hsgk1.

Dado que las dos cinasas homólogas de la familia sgk, hsgk2 y hsgk3, activan igualmente el ENaC, son adecuados 5 los polinucleótidos y anticuerpos específicos según la invención, que se dirigen hacia hsgk2 o hsgk3, en la misma medida para el análisis diagnóstico de las formas condicionadas genéticamente especiales de la hipertensión.

La determinación según la invención, que correlaciona la aparición de los dos SNP en el gen hsgk1 con una 10 tendencia a la hipertensión, muestra que especialmente los polinucleótidos, que comprenden una u otra versión de los dos SNP en el gen hsgk1, son adecuados en medida especial para la diagnosis de una forma de hipertensión condicionada genéticamente mediante la hibridación con ADN endógeno (ADNc o ADN genómico) o ARNm de una muestra corporal del paciente.

De manera similar son adecuados también según los presentes resultados los anticuerpos para la diagnosis de 15 una predisposición condicionada genéticamente a la hipertensión, que se dirigen hacia polimorfismos (SNP) específicos relevantes para la hipertensión en la proteína hsgk1 o una de sus homólogos humanos. Los SNP de este tipo, que conducen también a nivel de proteína a un polimorfismo relevante para la hipertensión, pueden ir acompañados especialmente de una modificación funcional de la proteína hsgk1 y de este modo originar una predisposición a la 20 hipertensión.

A este respecto se utilizan especialmente los dos SNP que se correlacionan con la tendencia a la hipertensión en el 25 gen hsgk1 para el diagnóstico cuantitativo de una hipertensión condicionada genéticamente.

En este procedimiento diagnóstico según la invención su utilizan como muestras corporales del paciente preferiblemente 30 muestras de sangre o también muestras de saliva, que comprenden material celular y que pueden obtenerse del paciente de un modo relativamente poco costoso. Sin embargo otras muestras corporales, que comprenden igualmente células tales como por ejemplo muestras de tejidos entre otros, también pueden utilizarse. A partir de este material que contiene células de las muestras corporales puede preparase entonces o bien ADNc o ADN genómico o bien también ARNm según métodos habituales (Sambrook-J y Russell-DW (2001) Cold Spring Harbor, NY, CSHL Press) y 35 dado el caso amplificarse y posteriormente hibridarse con polinucleótidos, que pueden hibridarse de manera específica con este ADNc, ADN genómico o también ARNm, en condiciones rigurosas. Además puede aislar tambien a partir del material que contiene células de las muestras corporales (sangre, saliva, tejidos, etcétera) también un extracto de proteína según métodos habituales (Sambrook-J y Russell-DW (2001) Cold Spring Harbor, NY, CSHL Press), en los que puede detectarse entonces cuantitativamente la proteína sgk correspondiente mediante la incubación con un anticuerpo, que se dirige hacia esta proteína.

En el procedimiento pueden utilizarse preferiblemente anticuerpos contra la proteína hsgk1 o polinucleótidos, que se hibridan con ARNm, ADNc o ADN genómico del gen hsgk1.

40 En el caso del procedimiento según la invención se utilizan especialmente polinucleótidos, que pueden hibridarse con ADN, ADNc o ARNm de una versión del SNP en el intrón 6 del gen hsgk1 o una versión del SNP en el exón 8 del gen hsgk1 en condiciones rigurosas.

Por una hibridación en condiciones rigurosas se entiende en este contexto una hibridación en condiciones de hibridación tales con respecto a la temperatura de hibridación y el contenido en formamida de la disolución de hibridación, 45 tal como se describieron en la bibliografía correspondiente (Sambrook-J y Russell-DW (2001) Cold Spring Harbor, NY, CSHL Press).

Por ejemplo, un kit diagnóstico puede contener de manera especialmente preferible polinucleótidos, que pueden 50 hibridarse con ADNc, con ADN genómico o con ARNm de una versión del SNP en el intrón 6 (T → C) o del SNP en el exón 8 (C → T).

Mediante el ejemplo 2 a continuación se explica en detalle la presente invención. El ejemplo 1 es material de comparación.

55

### Ejemplo 1

Se recurrió a 75 parejas de gemelos dicigóticos para el análisis de correlación (Busjahn *et al.*, J Hypertens 1996, 14: 60 1195-1199; Busjahn *et al.*, Hypertension 1997, 29: 165-170). Todas las personas sometidas al ensayo eran miembros de la raza alemana-caucasiana y procedían de distintas partes de Alemania. Para la verificación de la gemelaridad dicigótica y para análisis de genética molecular adicionales se extrajo sangre a las parejas de gemelos, así como a sus padres. Cada persona que participaba en el ensayo fue previamente examinada por un médico. No se conoció ninguna enfermedad médica crónica para ninguna de las personas sometidas al ensayo. Tras 5 min se midió la tensión arterial 65 de la persona sometida al ensayo en posición sentada por un médico formado con un esfigmomanómetro de mercurio estandarizado (2 mediciones con un intervalo de tiempo de 1 min). Se utilizó el valor medio de ambas mediciones como valor de tensión arterial.

## ES 2 266 463 T3

La ventaja de gemelos dicigóticos para los estudios de correlación se encuentra en que son concordantes en la edad y que se estiman las influencias externas en sus fenotipos como mínimas (Martin *et al.*, Nat Genet 1997, 17: 387-392).

El significado de estudios con gemelos para la aclaración de enfermedades genéticas complejas se describió brevemente por Martin *et al.*, 1997.

La gemelaridad dicigótica de las parejas de gemelos se confirmó mediante la amplificación con cinco marcadores de microsatélites con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este análisis de marcadores de microsatélites se amplifican fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) con ayuda de oligonucleótidos específicos mediante la PCR, que en individuos humanos diferentes contienen regiones altamente variables. La alta variabilidad en estas regiones del genoma puede detectarse mediante diferencias de tamaño reducidas de los fragmentos amplificados, mediante lo cual se forman, en una diversidad en el locus correspondientes bandas dobles, las denominadas bandas de microsatélite, tras la separación por electroforesis en gel del producto de la PCR (Becker *et al.*, J Reproductive Med 1997, 42: 260-266).

Para el análisis de genética molecular del gen diana, aquí el gen hsgk1, se amplificaron tres regiones de marcadores de microsatélites adicionales (d6s472, d6s1038, d6s270) en proximidad directa del locus hsgk1 mediante la PCR y posteriormente se compararon con las muestras correspondientes del otro gemelo y los padres. De esta manera pudo decidirse, si los gemelos habían heredado de sus padres alelos idénticos o diferentes con respecto al alelo estudiado. Se realizó el análisis de correlación con la ayuda del modelo denominado “modelo de ecuación estructural” (“structural equation modeling”) (SEM) (Eaves *et al.*, Behav Genet 1996, 26: 519-525; Neale, 1997: Mx: Statistical modeling, Box 126 MCV, Richmond, VA 23298: Departamento de psiquiatría, 4<sup>a</sup> edición). Este modelo se basa en matrices de varianza-covarianza de los pares de prueba, que se caracterizan por la probabilidad de que posean o bien ninguno, uno o dos alelos idénticos. La varianza con respecto al fenotipo se dividió en una varianza, que se basa en el fondo genético de todos los genes (A), una varianza, que se basa en el fondo del gen diana (Q), aquí el gen hsgk1, y la varianza a causa de influencias externas (E).

$$\text{VAR} = A^2 + Q^2 + E^2$$

Para las tres posibles combinaciones de alelos IBD<sub>0</sub>, IBD<sub>1</sub>, IBD<sub>2</sub> (IBD = “idéntico por descendencia” (“identical by descent”); 0, 1 o 2 alelos idénticos) se definió la covarianza de un par de prueba tal como sigue:

$$\text{COV}(\text{IBD}_0) = 0,5 \text{ A}^2 \quad \text{COV}(\text{IBD}_1) = 0,5 \text{ A}^2 + 0,5 \text{ Q}^2 \quad \text{COV}(\text{IBD}_2) = 0,5 \text{ A}^2 + \text{Q}^2$$

Para estimar la correlación entre la dotación genética del locus hsgk1 y la tensión arterial de las personas sometidas al ensayo, se calcularon las diferencias entre modelos, que consideran o no consideran la varianza genética con respecto al gen diana hsgk1, como estadística de  $\chi^2$ . Se calcularon para cada pareja y para cada locus génico las razones de alelo mediante el denominado modelo de múltiples puntos (“multipoint”) (MAPMAKER/SIBS; Kruglyak *et al.*, Am J Hum Genet 1995, 57: 439-454) basados en los genotipos paternos.

El mayor valor informativo del método de análisis, que se basa en una estimación de varianza-covarianza, en comparación con la estadística de  $\chi^2$  descrita anteriormente (S.A.G.E. Statistical Analysis for Genetic Epidemiology, Release 2.2. Computer program package, Departamento de Epidemiología y Bioestadística, Universidad de Case Western Reserve, Cleveland, OH, EE.UU, 1996) se confirmó brevemente en un estudio de simulación (Fulker *et al.*, Beha Gen 1996, 26: 527-532). Se aceptó un nivel de significación de  $p < 0,01$ , para garantizar una correlación significativa con respecto a los criterios de Lander y Kruglyak (Lander *et al.*, Nat Genet 1995, 11: 241-246).

La tabla 1 muestra los resultados de este estudio de correlación.

TABLA 1

55	Fenotipo	max $\chi^2$	P
	Tensión arterial sistólica (tumbada)	4,44	0,04
60	Tensión arterial diastólica (tumbada)	14,36	0,0002
	Tensión arterial sistólica (sentada)	5,55	0,019
	Tensión arterial diastólica (sentada)	4,92	0,027
65	Tensión arterial sistólica (de pie)	1,91	0,17
	Tensión arterial diastólica (de pie)	4,83	0,028

## ES 2 266 463 T3

Tal como se deduce de la tabla 1, los bajos valores para los niveles de significación p de error determinadas, que no superan o sólo ligeramente el nivel de significación de error aceptado de  $p < 0,01$ , demuestran la correlación directa entre la varianza genética con respecto al locus hsgk1 y la varianza determinada por fenotipos de la tensión arterial medida.

5

### Ejemplo 2

Ya se describió la organización genómica del gen hsgk1 (Waldegger *et al.*, Genomics, 51, 299 [1998]), [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/geneview?gene=ENSG00000118515](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000118515).

10

Para la identificación de los SNP, cuya aparición es relevante para una predisposición para la formación de una hipertensión, se estudiaron en primer lugar los SNP en el gen hsgk1 publicados en los bancos de datos para determinar si se trata de SNP reales (y no de puros errores de secuenciación) y si los SNP son suficientemente polimorfos para ser la base para una determinación diagnóstica de una predisposición a la hipertensión. El SNP rs 1057293 en el exón 8, que afecta a un intercambio de una C por una T, cumplió las condiciones requeridas ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/snpview?snp=1057293](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/snpview?snp=1057293); [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?type=rs&rs=1057293](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=1057293)). Además se identificó un segundo SNP mediante la secuenciación directa, que se localiza en el gen hsgk1 alejado exactamente 551 pb del primer SNP en el sitio donador-de empalme del intrón 6 con el exón 7 y afecta al intercambio de una T por una C. Se analizaron estos dos SNP en el intrón 6 (T → C) y en el exón 8 (C → T) tal como se describe a continuación.

20

Tras la amplificación por PCR se añadió en cada caso 1 unidad de fosfatasa alcalina y 1 unidad de exonucleasa I, para degenerar el cebador de la PCR y desfosforilar los dNTP. La PCR se realizó en las condiciones siguientes: 95°C durante 10 min, entonces 35 ciclos a 95° durante 15 s, seguido de 62°C durante 15 s, seguido de 72°C durante 30 s, y una etapa de extensión a 72°C durante 10 min en un ciclador térmico 9600 (Applied Biosystems).

25

Se realizaron las reacciones de minisecuenciación con los cebadores para el SNP del intrón 6 (T → C) 5'-CTC CTT GCA GAG TCC GAA y para el SNP del exón 8 (C → T) 5'-ACC AAG TCA TTC TGG GTT GC. Se utilizaron 0,15 pmol de producto de la PCR purificado en la PCR de secuenciación como molde. Para la PCR de secuenciación se realizaron 25 ciclos de amplificación con las etapas individuales siguientes: desnaturización durante 10 s a 96°C, etapa de hibridación durante 10 s a 50°C y etapa de extensión durante 30 s a 60°C en un ciclador térmico 9600.

30

En los mismos pacientes, cuyo genotipo de SNP del gen hsgk1 se determinó, se midieron los valores de tensión arterial sistólica y diastólica en posición tumbada, de pie y sentada, para establecer una correlación eventual entre el genotipo de SNP del gen hsgk1 y la tensión arterial.

35

La tabla 2 muestra algunos datos demográficos de gemelos y los resultados del análisis de correlación entre la dotación genética del locus génico hsgk1 y la tensión arterial medida. En las personas de prueba pudo determinarse una fuerte influencia genética sobre la tensión arterial medida en todas las posiciones.

40

TABLA 2

Fenotipo	Gemelos monocigóticos	Gemelos dicigóticos	$a^2(r_{\text{monocigótico}}/r_{\text{dicigótico}})$	p(correlación)
N	200	132		
Edad y	$29 \pm 12$	$31 \pm 12$		
Sexo (V/M)	52/148	85/47		
Estatura (cm)	$169 \pm 8$	$170 \pm 8$		
Peso (kg)	$65 \pm 11$	$67 \pm 12$		
Índice de masa corporal (IMC) peso/estatura <sup>2</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	$22,4 \pm 3,5$	$22,8 \pm 3,4$		
Tensión arterial sistólica (tumbada) (mm Hg)	$128 \pm 17$	$124 \pm 14$	0,69 (0,69/0,31)	0,04
Tensión arterial diastólica (tumbada) (mm Hg)	$71 \pm 12$	$71 \pm 11$	0,66 (0,66/0,42)	0,0002

# ES 2 266 463 T3

TABLA 2 (continuación)

Fenotipo	Gemelos monocigóticos	Gemelos dicigóticos	$a^2(r_{\text{monocigótico}}/r_{\text{dicigótico}})$	p(correlación)
Tensión arterial sistólica (sentada) (mm Hg)	125 ± 16	123 ± 13	0,74 (0,74/0,38)	0,019
Tensión arterial diastólica (sentada) (mm Hg)	73 ± 11	73 ± 10	0,72 (0,72/0,51)	0,027
Tensión arterial sistólica (de pie) (mm Hg)	124 ± 15	122 ± 14	0,67 (0,66/0,48)	0,04
Presión arterial diastólica (de pie) (mm Hg)	80 ± 10	79 ± 10	0,64 (0,63/0,40)	0,0002

20

La tabla 3 muestra resultados adicionales de los estudios de correlación según la invención. Las frecuencias alélicas determinadas para el SNP en el exón 8 se encuentran en el 91% de C y el 9% de T y para el SNP en el intrón 6 en el 79% de T y el 21% de C (se obtuvo para ambos polimorfismos el equilibrio de Hardy-Weinberg).

25

Los valores de tensión arterial medidos mostraron en todas las posiciones (sentada,tumbada, de pie) las mismas tendencias. Los portadores de CC homocigóticos y los portadores de CT heterocigóticos del SNP en el exón 8 no mostraron ningún valor de tensión arterial que difieren entre sí, sin embargo mostraron valores de tensión arterial sistólica y diastólica claramente inferiores que los portadores de TT homocigóticos del SNP en el exón 8.

30

Los resultados correspondientes de los estudios de correlación son menos consistentes para el SNP en el intrón 6 en comparación con el SNP en el exón 8. Sin embargo se demostró, que los portadores de CC homocigóticos del SNP en el intrón 6 presentan generalmente valores de tensión arterial inferiores que los portadores de TT homocigóticos y que los portadores de TC heterocigóticos del SNP en el intrón 6.

35

TABLA 3

Fenotipo	1 <sup>er</sup> SNP en el exón 8 CC	1 <sup>er</sup> SNP en el exón 8 CT	1 <sup>er</sup> SNP en el exón 8 TT	1 <sup>er</sup> SNP en el exón 8 CC/TT	2 <sup>o</sup> SNP en el intrón 6 TT	2 <sup>o</sup> SNP en el intrón 6 CT	2 <sup>o</sup> SNP en el intrón 6 CC	2 <sup>o</sup> SNP en el intrón 6 TT/CT
Tensión arterial sist. (tumbada)	125 ± 15	125 ± 18	132 ± 14	125 ± 16	125 ± 16	128 ± 18	119 ± 6	126 ± 16
Tensión arterial diast. (tumbada)	70 ± 10	72 ± 13	74 ± 12	71 ± 11	71 ± 10	72 ± 13	67 ± 10	71 ± 11
Tensión arterial sist. (sentada)	124 ± 14	123 ± 15	129 ± 13	124 ± 14	124 ± 14	125 ± 17	117 ± 6	124 ± 14
Tensión arterial diast. (sentada)	72 ± 10	74 ± 10	79 ± 9	73 ± 10	73 ± 10	74 ± 11	72 ± 9	73 ± 10
Tensión arterial sist. (de pie)	123 ± 15	123 ± 14	129 ± 13	123 ± 15	123 ± 14	126 ± 16	119 ± 8	123 ± 15
Tensión arterial diast. (de pie)	79 ± 10	81 ± 10	84 ± 8	80 ± 10	80 ± 10	82 ± 11	78 ± 8	80 ± 10

65

La tabla 4 muestra en detalle, que tanto para el valor de tensión arterial sistólico como para el diastólico la dotación genética del SNP en el intrón 6 es en su mayoría igualmente significativa, y concretamente independiente de la posición

## ES 2 266 463 T3

en la que se midió la tensión arterial (sentada, de pie, tumbada). Los resultados de la significación de la dotación genética del SNP en el exón 8 son similares, la asociación de la significación entre los valores de tensión arterial sistólicos y diastólicos medidos en las diferentes posiciones es sin embargo algo menos marcada que en el SNP en el intrón 6.

5

TABLA 4

Fenotipo	2º SNP en el intrón 6	1º SNP en el exón 8
Tensión arterial sistólica (tumbada)	< 0,01	< 0,05
Tensión arterial diastólica (tumbada)	< 0,05	0,08
Tensión arterial sistólica (sentada)	< 0,05	< 0,05
Tensión arterial diastólica (sentada)	< 0,01	0,08
Tensión arterial sistólica (de pie)	< 0,05	0,07
Tensión arterial diastólica (de pie)	< 0,05	0,09

10 Tal como puede deducirse a partir de la tabla 5, existe un fuerte desequilibrio de correlación entre los dos SNP  
15 analizados: mientras que la mayoría de los portadores de CC del SNP en el exón 8 también son portadores de TT del SNP en el intrón 6 (el 64%), no se da el caso contrario (sólo el 2% de los portadores de TT del exón 8 son también portadores de CC del intrón 6).

20

TABLA 5

	Intrón 6 TT	Intrón 6 TC	Intrón 6 CC
Exón 8 CC	197 (64%)	59 (19%)	3 (1%)
Exón 8 CT	2 (1%)	30 (10%)	11 (4%)
Exón 8 TT	0 (0%)	0 (0%)	6 (2%)

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 266 463 T3

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para la diagnosis de una predisposición condicionada genéticamente a la hipertensión, **caracterizado** porque se determinan en una muestra corporal de un paciente
  - 5 (a) el SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) correlacionado con la hipertensión en el exón 8 (C → T) en el gen hsgk1, tal como se muestra en la SEQ ID No: 1;
  - (b) el SNP correlacionado con la hipertensión en el intrón 6 (T → C) en el gen hsgk1, que se localiza 551 pb aguas 10 arriba del SNP del exón 8 de (a); o
  - (c) el SNP correlacionado con la hipertensión de (a) y el SNP correlacionado con la hipertensión de (b).
- 15 2. Uso del SNP correlacionado con la hipertensión en el exón 8 (C → T) en el gen hsgk1, tal como se muestra en la SEQ ID No: 1, del SNP correlacionado con la hipertensión en el intrón 6 (T → C) en el gen hsgk1, que se localiza 551 pb aguas arriba del SNP del exón 8 de (a), o ambos SNP para la producción de un procedimiento diagnóstico para la diagnosis de una predisposición condicionada genéticamente a la hipertensión.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 266 463 T3

Figura 1:

```

1      ENSE00000798789   AL135839.15.1.113673 -1    27517  27634  118 pb
      GGCTTTGACCGTAAACGTCTTCCTGCTCCCGGGTGTGATGACGGT
      GAAAACGTAGGGCTGCTAAGGCCACCCCACTTACTCAGGATGAGGGCA
      TGGTGGCAATTCTCATCG
2      ENSE00000798790   AL135839.15.1.113673 -1    27296  27371  76 pb
      GCCAAATAACTCTTATGCATGCAAACA
3      ENSE00000798791   AL135839.15.1.113673 -1    26790  26865  76 pb
      CCCTCATGAAAGCAGACGAGATGGCTTGAAACGACTTTATCAGAAGATT
      TTATGAATGCCAACCCCTCTCCCTCA
4      ENSE00000798792   AL135839.15.1.113673 -1    26247  26351  105 pb
      CCAAGTCCCTCAGCAAATCAACCTTGGCCCGTCGTCARCTCTCATGC
      TAAACCATCTGACTTCACTTCTTGAAAGTGTATGGAAAGGCAGTTTG
      GAAAG
5      ENSE00000798793   AL135839.15.1.113673 -1    26059  26142  84 pb
      GTTCTTCTACGAAAGCACRCAAGCCAGAAGTGTCTATGCACTCAAAGT
      TTTACAGAAGARASCAATCTGAAAGAAGAAGAAG
6      ENSE00000798794   AL135839.15.1.113673 -1    25808  25939  132 pb
      GAGAGACATATTATGTCGGAGCGGAATGTTCTGTTGAGAATGTGAGCA
      CCCCTTCTGGTGGCCCTTCACCTCTCTCCAGACTGCTGACAAATTGT
      ACTTTGCTTAGACTACATTATGGTGGAGAG
7      ENSE00000798795   AL135839.15.1.113673 -1    25447  25569  113 pb
      TTGTTCTACCATCTCAGAGGAAACGCTGCTTCTGGAAACCCACGGCTCG
      TTTCTATGCTGCTGAAATAGCCAGTGGCTTACCTGCAATTCACTGA
      ACATCGTTATAG
8      ENSE00000798796   AL135839.15.1.113673 -1    24978  25101  124 pb
      AGACTTAAACACAGAAATTTTGCTAGATTTCAGGACACATGTCCTG
      ACTGATTCGCACTCTGGAGGAGACATGACACAAACAGCACACACA
      TCCACCTCTGGSCACGGGGAG
9      ENSE00000798797   AL135839.15.1.113673 -1    24422  24517  96 pb
      TATCTCCGACCTGAGGTGCTCATGAGCCTPATGACAGGACTGTGGA
      CTGGTGGCTGGGGCTGTGCTTGTGATGAGATGCTGTATGGCCCTG
10     ENSE00000798798   AL135839.15.1.113673 -1    23808  23963  156 pb
      CCCCTTTTATATAGCCAGAACACACTGAATGACACACATCTGAA
      CAAGCCTCTCAGCTGAAACCAAAATTACAAATTCGGCAAGACACCTCC
      TGGAGGGCCCTCTGAGAGGACAGGACAAAGGCGCTGGGGCGAGGAT
      GACTTC
11     ENSE00000798799   AL135839.15.1.113673 -1    23611  23700  90 pb
      ATGGAGATTAAAGAGTCATGTCCTTCCTCCCTTAATTAACTGGGATGATCT
      CATTAATAAGAGATTACTCCCTCTTAAACCAAAATGTC
12     ENSE00000798800   AL135839.15.1.113673 -1    22037  23220  1184 pb
      AGTGGCCCACACGACTTGGCACTTGGCAAGGGAGTTACCGAGAGGCC
      TGTCGCCAACACTCATTGGCAAGTGGCCCTGTGACAGCGCTCTGGTCAACAGCA
      CGCTCAAGGANGCTGGCGAGCTTCTAGGCTTTCTATGCCCTCCC
      ACGGGACTCTCCCTCTGAAACCTGTTAGGGCTGGTTTAAAGGATTTTA
      TGTGTTCTGGAAATGTTTGTAGGCTTGTGGTGGAGCTGCTGATGGCTG
      CAGGACATCTACAGAGAAATTGGCACATCTCTGGAAAGCTTGTGCAATCTT
      ATTGCAACATGTTGGCTGGAGCTTGGAAAGGACACATTCTCCCTGAGT
      AGCTCATGAGGTTTCAATTCTCTCCACAGTGGCTCATCTC
      TGAAACGAGCGTTAGACTGGCGCTTAGACGGAGGGCAGGATTTGGTTAG
      AAAGGGGACGCTGTTCTZAAAAGGCTCTGCAAGATCTGCTGGGCTGT
      GATGAGAAATATTGAAATGTCCTTCTGAGAGATTGTGACTCT
      CAAACCTTTCTTCTATGGCACTGTTGAGTTCTTATTTCCCTTGTGGAT
      ATGGCTGTGAGACCGTGTGAGTGTTGATGCCCTGATCACAGATGGAT
      TTGTTTAAAGCTCATGTGACACTGGAGACACTACAAACGTGGGACA
      TGTTTGTCTCCATTTGGAAAGATAATTATGTTGAGACTTTTTT
      GAAAGATACGGTTAAATACAAATTATTGAAATGTCCTGCAATGACT
      CGTATTCTGAGATCTTAAAGAAGCATTGCTGCTACAAATTTCTATTCT
      TAGAAGGGTTTATGGACCAATGCCCTGGTGTGAGTCAAGACCCGGT
      TGTTTCTCATGTTAAATGTCACCTGTAAGAAGGGCATTTATGTT
      TTTTTTTTGTGATTCCTGATAATTGTAATGTTATGTTAAGAAGCTG
      TACATTGGGTTATAACACTGATAATTAAACTTACAGGCTTATTGTAA
      TGTAAACACCAATTAAATGACTGTAATTAAACATGGTTATAATACGTAC
      ATCCCTCCCTCATCCCATCACACAACTTTTTGTGTTGATCAAACG
      TTTGGTTGCAATAAAACCTGAAAGAATATTAA

```

# ES 2 266 463 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Lang, Florian  
<120> Análisis diagnóstico cuantitativo de la hipertensión  
5 <130> L61882  
<140> DE 101 13 876.8  
<141> 2001-03-21  
10 <160> 2  
<170> PatentIn versión 3.1  
<210> 1  
<211> 2354  
15 <212> ADN  
<213> *homo sapiens*  
<220>  
20 <221> CDS  
<222> (43)..\_(1335)\_  
<223>  
<220>  
25 <221> variación  
<222> (762)..(762)\_  
<223> 1<sup>er</sup> SNP (C en T), mutación silenciosa, es decir ambas versiones del SNP resultan en el aminoácido Asp en la  
30 posición de aminoácido 240  
<400> 1

35	ggtctttgag cgctaacgtc tttctgtctc cccgcggtgg tg atg acg gtg aaa Met Thr Val Lys 1	54
40	act gag gct aag ggc acc ctc act tac tcc agg atg agg ggc atg Thr Glu Ala Ala Lys Gly Thr Leu Thr Tyr Ser Arg Met Arg Gly Met 5 10 15 20	102
45	gtg gca att ctc atc gct ttc atg aag cag agg agg atg ggt ctg aac Val Ala Ile Leu Ile Ala Phe Met Lys Gln Arg Arg Met Gly Leu Asn 25 30 35	150
50	gac ttt att cag aag att gcc aat aac tcc tat gca tgc aaa cac cct Asp Phe Ile Gln Lys Ile Ala Asn Asn Ser Tyr Ala Cys Lys His Pro 40 45 50	198
55	gaa gtt cag tcc atc ttg aag atc tcc caa cct cag gag cct gag ctt Glu Val Gln Ser Ile Leu Lys Ile Ser Gln Pro Gln Glu Pro Glu Leu 55 60 65	246
60	atg aat gcc aac cct tct cct cca cca agt cct tct cag caa atc aac Met Asn Ala Asn Pro Ser Pro Pro Ser Pro Ser Gln Gln Ile Asn 70 75 80	294

## ES 2 266 463 T3

	ctt ggc ccg tcg tcc aat cct cat gct aaa cca tct gac ttt cac ttc Leu Gly Pro Ser Ser Asn Pro His Ala Lys Pro Ser Asp Phe His Phe 85 90 95 100	342
5	ttg aaa gtg atc gga aag ggc agt ttt gga aag gtt ctt cta gca aga Leu Lys Val Ile Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val Leu Leu Ala Arg 105 110 115	390
10	cac aag gca gaa gaa gtg ttc tat gca gtc aaa gtt tta cag aag aaa His Lys Ala Glu Glu Val Phe Tyr Ala Val Lys Val Leu Gln Lys Lys 120 125 130	438
15	gca atc ctg aaa aag aaa gag gag aag cat att atg tcg gag cgg aat Ala Ile Leu Lys Lys Glu Glu Lys His Ile Met Ser Glu Arg Asn 135 140 145	486
20	gtt ctg ttg aag aat gtg aag cac cct ttc ctg gtg ggc ctt cac ttc Val Leu Leu Lys Asn Val Lys His Pro Phe Leu Val Gly Leu His Phe 150 155 160	534
25	tct ttc cag act gct gac aaa ttg tac ttt gtc cta gac tac att aat Ser Phe Gln Thr Ala Asp Lys Leu Tyr Phe Val Leu Asp Tyr Ile Asn 165 170 175 180	582
30	ggg gga gag ttg ttc tac cat ctc cag egg gaa cgc tgc ttc ctg gaa Gly Gly Glu Leu Phe Tyr His Leu Gln Arg Glu Arg Cys Phe Leu Glu 185 190 195	630
35	cca cgg gct cgt ttc tat gct gct gaa ata gcc agt gcc ttg ggc tac Pro Arg Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ala Ser Ala Leu Gly Tyr 200 205 210	678
40	ctg cat tca ctg aac atc gtt tat aga gac tta aaa cca gag aat att Leu His Ser Leu Asn Ile Val Tyr Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile 215 220 225	726
45	ttg cta gat tca cag gga cac att gtc ctt act gac ttc gga ctc tgc Leu Leu Asp Ser Gln Gly His Ile Val Leu Thr Asp Phe Gly Leu Cys 230 235 240	774
50	aag gag aac att gaa cac aac ayc aca aca tcc acc ttc tgt ggc aog Lys Glu Asn Ile Glu His Asn Ser Thr Thr Ser Thr Phe Cys Gly Thr 245 250 255 260	822
55	ccg gag tat ctc gca cct gag gtg ctt cat aag cag cct tat gac agg Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu His Lys Gln Pro Tyr Asp Arg 265 270 275	870
60	act gtg gac tgg tgg tgc ctg gga gct gtc ttg tat gag atg ctg tat Thr Val Asp Trp Trp Cys Leu Gly Ala Val Leu Tyr Glu Met Leu Tyr 280 285 290	918
65	ggc ctg ccg cct ttt tat agc cga aac aca gct gaa atg tac gac aac Gly Leu Pro Pro Phe Tyr Ser Arg Asn Thr Ala Glu Met Tyr Asp Asn 295 300 305	966

# ES 2 266 463 T3

	att ctg aac aag cct ctc cag ctg aaa cca aat att aca aat tcc gca Ile Leu Asn Lys Pro Leu Gln Leu Lys Pro Asn Ile Thr Asn Ser Ala 310 315 320	1014
5	aga cac ctc ctg gag ggc ctc ctg cag aag gac agg aca aag cgg ctc Arg His Leu Leu Glu Gly Leu Leu Gln Lys Asp Arg Thr Lys Arg Leu 325 330 335 340	1062
10	ggg gcc aag gat gac ttc atg gag att aag agt cat gtc ttc ttc tcc Gly Ala Lys Asp Asp Phe Met Glu Ile Lys Ser His Val Phe Phe Ser 345 350 355	1110
15	tta att aac tgg gat gat ctc att aat aag aag att act ccc cct ttt Leu Ile Asn Trp Asp Asp Leu Ile Asn Lys Lys Ile Thr Pro Pro Phe 360 365 370	1158
20	aac cca aat gtg agt ggg ccc aac gac cta cgg cac ttt gac ccc gag Asn Pro Asn Val Ser Gly Pro Asn Asp Leu Arg His Phe Asp Pro Glu 375 380 385	1206
25	ttt acc gaa gag cct gtc ccc aac tcc att ggc aag tcc cct gac ayc Phe Thr Glu Glu Pro Val Pro Asn Ser Ile Gly Lys Ser Pro Asp Ser 390 395 400	1254
30	gtc ctc gtc aca gcc agc gtc aag gaa gct gcc gag gct ttc cta ggc Val Ieu Val Thr Ala Ser Val Lys Glu Ala Ala Glu Ala Phe Leu Gly 405 410 415 420	1302
35	ttt tcc tat gcg cct ccc acg gac tct ttc ctc tgaaccctgt tagggcttgg Phe Ser Tyr Ala Pro Pro Thr Asp Ser Phe Leu 425 430	1355
40	ttttaaagga ttttatgtgt gtttccgaat gtttttagtta gccttttgtt ggagccggcca gctgacagga catcttacaa gagaatttgc acatctctgg aagcttagca atcttattgc acactgttcg ctggaagctt tttgaagagc acattctctc cagttagctc atgagggttt catttttatt ctcccttcca acgtggtgct atctctgaaa cgagcgtagt agtgcggcct tagacggagg caggagttc gtttagaaagc ggacgctgtt ctaaaaaagg tctcctgcag atctgtctgg gctgtatgtca cgaatattat gaaatgtgcc ttttctgaag agattgtgtt agctccaaag ctttccttat cgcaatgtttt cagttttttt ttttcccttg tggatattgtct gtgtgaaccg tcgtgtgagt gtggatgcc tgatcacaga tggattttgt tataagcatc aatgtgacac ttgcaggaca ctacaacgtg ggacattgtt tgtttcttcc atatttggaa gataaattttt tttttgtact tttttgttaa atacggtaa taactaaaat ttattgaaat ggtcttgc当地 tgactcgtat tcagatgtttt aaagaaaagca ttgctgtac aaatatttct attttttagaa agggttttt tggaccaatg ccccagttgt cagtcagagc cgttgggttt tttcattgtt taaaatgtca cctgtaaaat gggcattatt tatgtttttt tttttgcatt	1415 1475 1535 1595 1655 1715 1775 1835 1895 1955 2015 2075 2135
55	cctgataatt gtatgttattt tataaagaac gtctgtacat tgggttataa cactagtata tttaaaactta caggcttattt tgtaatgtaa accaccattt taatgtactg taattaacat ggttataata cgtacaatcc ttccctcatac ccatcacaca acttttttg tttgtgtataa actgttttg gtttgcaata aaacccgtttaaaat	2195 2255 2315 2354
60		

ES 2 266 463 T3

<210> 2  
<211> 431  
<212> PRT  
5 <213> *homo sapiens*  
<400> 2

10        Met Thr Val Lys Thr Glu Ala Ala Lys Gly Thr Leu Thr Tyr Ser Arg  
            1                    5                    10                    15

15        Met Arg Gly Met Val Ala Ile Leu Ile Ala Phe Met Lys Gln Arg Arg  
            20                    25                    30

20        Met Gly Leu Asn Asp Phe Ile Gln Lys Ile Ala Asn Asn Ser Tyr Ala  
            35                    40                    45

25        Cys Lys His Pro Glu Val Gln Ser Ile Leu Lys Ile Ser Gln Pro Gln  
            50                    55                    60

30        Glu Pro Glu Leu Met Asn Ala Asn Pro Ser Pro Pro Pro Ser Pro Ser  
            65                    70                    75                    80

35        Gln Gln Ile Asn Leu Gly Pro Ser Ser Asn Pro His Ala Lys Pro Ser  
            85                    90                    95

40        Asp Phe His Phe Leu Lys Val Ile Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val  
            100                    105                    110

45        Leu Leu Ala Arg His Lys Ala Glu Glu Val Phe Tyr Ala Val Lys Val  
            115                    120                    125

50        Leu Gln Lys Lys Ala Ile Leu Lys Lys Glu Glu Lys His Ile Met  
            130                    135                    140

55        Ser Glu Arg Asn Val Leu Leu Lys Asn Val Lys His Pro Phe Leu Val  
            145                    150                    155                    160

60

65

ES 2 266 463 T3

Gly Leu His Phe Ser Phe Gln Thr Ala Asp Lys Leu Tyr Phe Val Leu  
165 170 175

5 Asp Tyr Ile Asn Gly Gly Glu Leu Phe Tyr His Leu Gln Arg Glu Arg  
180 185 190

10 Cys Phe Leu Glu Pro Arg Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ala Ser  
195 200 205

Ala Leu Gly Tyr Leu His Ser Leu Asn Ile Val Tyr Arg Asp Leu Lys  
210 215 220

15 Pro Glu Asn Ile Leu Leu Asp Ser Gln Gly His Ile Val Leu Thr Asp  
225 230 235 240

20 Phe Gly Leu Cys Lys Glu Asn Ile Glu His Asn Ser Thr Thr Ser Thr  
245 250 255

25 Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu His Lys Gln  
260 265 270

30 Pro Tyr Asp Arg Thr Val Asp Trp Trp Cys Leu Gly Ala Val Leu Tyr  
275 280 285

35 Glu Met Leu Tyr Gly Leu Pro Pro Phe Tyr Ser Arg Asn Thr Ala Glu  
290 295 300

Met Tyr Asp Asn Ile Leu Asn Lys Pro Leu Gln Leu Lys Pro Asn Ile  
305 310 315 320

40 Thr Asn Ser Ala Arg His Leu Leu Glu Gly Leu Leu Gln Lys Asp Arg  
325 330 335

45 Thr Lys Arg Leu Gly Ala Lys Asp Asp Phe Met Glu Ile Lys Ser His  
340 345 350

50 Val Phe Phe Ser Leu Ile Asn Trp Asp Asp Leu Ile Asn Lys Lys Ile  
355 360 365

55 Thr Pro Pro Phe Asn Pro Asn Val Ser Gly Pro Asn Asp Leu Arg His  
370 375 380

Phe Asp Pro Glu Phe Thr Glu Glu Pro Val Pro Asn Ser Ile Gly Lys  
385 390 395 400

60 Ser Pro Asp Ser Val Leu Val Thr Ala Ser Val Lys Glu Ala Ala Glu  
405 410 415

65 Ala Phe Leu Gly Phe Ser Tyr Ala Pro Pro Thr Asp Ser Phe Leu  
420 425 430