



19



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**

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

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

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

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

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

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  $\text{Na}^+$  epitelial (ENaC) (Chen *et al.*, 1999; Naray-Pejes-Toth *et al.*, 1999). El ENaC desempeña a su vez un papel decisivo en la eliminación renal de  $\text{Na}^+$ . 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, hipermetabolismo, 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  $\text{Na}^+$  endotelial, mediante lo cual se aumenta la reabsorción renal de  $\text{Na}^+$ . Dado que este aumento de la reabsorción renal de  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+$  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.

60 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*.

65 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.

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 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 ( $C \rightarrow T$ ) 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 ( $T \rightarrow C$ ) (2<sup>o</sup> 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 ( $C \rightarrow T$ ) 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 ( $C \rightarrow T$ ) en el 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 ( $T \rightarrow C$ ) en el intrón 6 se identificó mediante secuenciación directa, y se caracteriza claramente 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 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 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 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

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 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 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 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 hipertensión.

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

En este procedimiento diagnóstico según la invención se utilizan como muestras corporales del paciente preferiblemente 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 prepararse 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 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 aislarse también 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.

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, 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 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.

#### Ejemplo 1

Se recurrió a 75 parejas de gemelos dicigóticos para el análisis de correlación (Busjahn *et al.*, J Hypertens 1996, 14: 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 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, 4ª 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:

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

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.*, Behav Genet 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

Fenotipo	$\max \chi^2$	P
Tensión arterial sistólica (tumbada)	4,44	0,04
Tensión arterial diastólica (tumbada)	14,36	0,0002
Tensión arterial sistólica (sentada)	5,55	0,019
Tensión arterial diastólica (sentada)	4,92	0,027
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.

### 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).

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.

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°C 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).

Se realizaron las reacciones de minisequenciación 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: desnaturalización 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.

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.

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.

TABLA 2

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

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).

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.

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.

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

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.

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

Tal como puede deducirse a partir de la tabla 5, existe un fuerte desequilibrio de correlación entre los dos SNP 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).

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%)



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

(a) el SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) correlacionado con la hipertensión en el exón 8 ( $C \rightarrow T$ ) 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 ( $T \rightarrow C$ ) en el gen hsgk1, que se localiza 551 pb aguas 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).

2. Uso del SNP correlacionado con la hipertensión en el exón 8 ( $C \rightarrow T$ ) en el gen hsgk1, tal como se muestra en la SEQ ID No: 1, del SNP correlacionado con la hipertensión en el intrón 6 ( $T \rightarrow C$ ) 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.

Figura 1:

1 ENSE00000798789 AL135839.15.1.113673 -1 27517 27634 118 pb  
 GGTCTTTGAGCGCTAACGTCTTCTGTCTCCCCGCGTGGTGATGACGGT  
 GAAACTGAGGCTGCTAAGGGCACCCCTCACTTACTCCAGGATGAGGGGCA  
 TGGTGGCAATTCTCATCG

2 ENSE00000798790 AL135839.15.1.113673 -1 27296 27371 76 pb  
 CTTTCATGAAGCAGAGGAGGATGGCTCTGAACGACTTTATTGAGAAGATT  
 GCCAATAACTCCTATGCATGCAACA

3 ENSE00000798791 AL135839.15.1.113673 -1 26790 26865 76 pb  
 CCTGAAGTTCACTCCATCTTGAAGATCTCCCACTCAGGAGCCTGAGC  
 TTATGAATGCCAACCCCTTCTCCTCCA

4 ENSE00000798792 AL135839.15.1.113673 -1 26247 26351 105 pb  
 CCAAGTCTTCTCAGCAATCAACCTTGGCCGCTGTCCTCACTCCTCATGC  
 TAAACCTCTGACTTTCACCTTCTTGAAGTGATCGGAAAGGSCAGTTTGG  
 GAAAG

5 ENSE00000798793 AL135839.15.1.113673 -1 26059 26142 84 pb  
 GTTCTTCTAGCAAGACACAGGCGAGAAGTGTCTATGCAGTCAAGT  
 TTTACAGAAGAAAGCAATCCTGAAAAGAAAGAG

6 ENSE00000798794 AL135839.15.1.113673 -1 25808 25939 132 pb  
 GAGAAGCATATTATGTGCGAGCGGAATGTTCTGTTGAAGAATGTGAAGCA  
 CCCTTTCTGTTGGGCTTCACTTCTCTTTCAGACTGCTGACAAATTGT  
 ACTTTGCTAGACTACATTAATGGTGGAGAG

7 ENSE00000798795 AL135839.15.1.113673 -1 25447 25559 113 pb  
 TTGTTCTACCATCTCCAGAGGGAACGCTGCTTCTTGAACCAAGGCGCTCG  
 TTTCTATGCTGCTGAAATAGCCAGTGCCTTGGGCTACCTGCATTCACTGA  
 ACATCGTTTATAG

8 ENSE00000798796 AL135839.15.1.113673 -1 24978 25101 124 pb  
 AGACTTAAACCCAGAGAATATTTTGTAGATTTCAGGAGCACTTGTCTG  
 ACTGATTCGCGACTCTGCGAGGAGACATTTGAACACAACAGCACAAACA  
 TCCACCTTCTGTGGCAGCGCGGAG

9 ENSE00000798797 AL135839.15.1.113673 -1 24422 24517 96 pb  
 TATCTCGCACCTGAGGTGCTTCATAAGCAGCCTTATGACAGGACTGTGGA  
 CTGGTGGTGCCTGGGAGCTGTCTTGTATGAGATGCTGTATGGCCTG

10 ENSE00000798798 AL135839.15.1.113673 -1 23808 23963 156 pb  
 CCGCCTTTTATAGCCGAACACAGCTGAATGTACGACACATTCTGAA  
 CAAGCCTCTCCAGCTGAACCAATATTAACAATCCGCAAGACACCTCC  
 TGGAGGGGCTCCTCGAGAAGGACAGGACAAAGCGGCTCGGGCCAAAGGAT  
 GACTTC

11 ENSE00000798799 AL135839.15.1.113673 -1 23611 23700 90 pb  
 ATGGAGATTAAAGATCATGCTCTTCTCTCTTAATTAAGTGGATGATCT  
 CATTAATAAGAGATTACTCCCCCTTTTAACCCAAATGTG

12 ENSE00000798800 AL135839.15.1.113673 -1 22037 23220 1184 pb  
 AGTGGGCCCAACGCACTACGGCACTTTGACCCGAGTTTACCGAAGAGCC  
 TGTCCCAACTCCATTGGCAAGTCCCTGACAGGCTCTCTGACAGCCA  
 GCGTCAAGGAAGCTGCCGAGCTTTCTAGGCTTTTCTATGCGCCTCCC  
 ACGGACTCTTCTCTGTAACCTGTAGGGCTTGGTTTAAAGGATTTA  
 TGTGTGTTTCCGAATGTTTATGTTAGCCTTTTGGTGGAGCCGCACTGA  
 CAGGACATCTTACAGAGAATTTGCACATCTCTGGAAGCTTAGCAATCTT  
 ATTGCACACTGTTCCGCTGGAAGCTTTTGAAGACACATTCCTCTAGTG  
 AGCTCATGAGGTTTTCATTTTTATTCTTCTTCCAAAGCTGGTCTATCTC  
 TGAACGAGCGTTAGAGTGCCGCTTAGACGAGGAGGAGTTTCTGTAG  
 AAGCGGAGCGCTGTTCTAAAAAAGGCTCTCTGCAATCTGCTGGGCTGT  
 GATGACGAATATTATGAATGTGCTTTTCTGAAGAGATTGTTAGCTC  
 CAAAGCTTTTCTATCGCAGTGTTCAGTTCTTTATTTTCCCTTGTGGAT  
 ATGCTGTGTGAACCGTCTGTGTGAGTGTGGTATGCTGATCAGATGGAT  
 TTTGTTATAAGCATCAATGTGACACTTGCAGGACACTACAAGTGGGACA  
 TTGTTGTTTCTTCCATATTGGAAGATAAATTATGTGTAGACTTTT  
 GTAAGATACGGTTAATAACTAAAAATTATTGAATGGTCTTGCAATGACT  
 CGTATTCAGATGCTTAAAGAAAGCAATGTGCTACAAATATTCTATT  
 TAGAAGGGTTTATGAGCAATGCCAGTTGTCAAGTCAAGCGGTTG  
 GTGTTTTTCATTGTTTAAATGTCACTGTAAATGGGCATTATTATGT  
 TTTTTTTTTGCAATCCTGATAATTGTATGTATTGTAAGAAGCTGTG  
 TACATTGGGTTATAACACTAGTATATTTAAACTTACAGGCTTATTGTAA  
 TGTAAACCAACATTTTATGTACTGTAATTACATGGTTATAATACGTAC  
 AATCCTTCCCTCATCCCATCACACACTTTTTTGTGTGTGATAAAGCTG  
 TTTTSGTTTGAATAAACCTTGAAAAATATTTA

# ES 2 266 463 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Lang, Florian  
 <120> Análisis diagnóstico cuantitativo de la hipertensión  
 <130> L61882  
 <140> DE 101 13 876.8  
 <141> 2001-03-21  
 <160> 2  
 <170> PatentIn versión 3.1  
 <210> 1  
 <211> 2354  
 <212> ADN  
 <213> *homo sapiens*  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (43)..\_(1335)\_  
 <223>  
 <220>  
 <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 posición de aminoácido 240  
 <400> 1

```

    ggtctttgag cgctaacgtc tttctgtctc cccgcggtgg tg atg acg gtg aaa      54
                                     Met Thr Val Lys
                                     1

    act gag gct gct aag ggc acc ctc act tac tcc agg atg agg ggc atg      102
    Thr Glu Ala Ala Lys Gly Thr Leu Thr Tyr Ser Arg Met Arg Gly Met
    5          10          15          20

    gtg gea att ctc atc gct ttc atg aag cag agg agg atg ggt ctg aac      150
    Val Ala Ile Leu Ile Ala Phe Met Lys Gln Arg Arg Met Gly Leu Asn
          25          30          35

    gac ttt att cag aag att gcc aat aac tcc tat gca tgc aaa cac cct      198
    Asp Phe Ile Gln Lys Ile Ala Asn Asn Ser Tyr Ala Cys Lys His Pro
          40          45          50

    gaa gtt cag tcc atc ttg aag atc tcc caa cct cag gag cct gag ctt      246
    Glu Val Gln Ser Ile Leu Lys Ile Ser Gln Pro Gln Glu Pro Glu Leu
          55          60          65

    atg aat gcc aac cct tct cct cca cca agt cct tct cag caa atc aac      294
    Met Asn Ala Asn Pro Ser Pro Pro Pro Ser Pro Ser Gln Gln Ile Asn
          70          75          80
  
```

# ES 2 266 463 T3

5	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
10	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
15	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
20	gca atc ctg aaa aag aaa gag gag aag cat att atg tcg gag ccg aat Ala Ile Leu Lys Lys Lys Glu Glu Lys His Ile Met Ser Glu Arg Asn 135 140 145	486
25	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
30	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
35	ggt gga gag ttg ttc tac cat ctc cag agg 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
40	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
45	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
50	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
55	aag gag aac att gaa cac aac agc aca aca tcc acc ttc tgt ggc aag Lys Glu Asn Ile Glu His Asn Ser Thr Thr Ser Thr Phe Cys Gly Thr 245 250 255 260	822
60	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
65	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
	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

5	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
10	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
15	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
20	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
25	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
30	ttt acc gaa gag cct gtc ccc aac tcc att ggc aag tcc cct gac agc Phe Thr Glu Glu Pro Val Pro Asn Ser Ile Gly Lys Ser Pro Asp Ser 390 395 400	1254
35	gtc ctc gtc aca gcc agc gtc aag gaa gct gcc gag gct ttc cta ggc Val Leu Val Thr Ala Ser Val Lys Glu Ala Ala Glu Ala Phe Leu Gly 405 410 415 420	1302
40	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
45	ttttaaagga ttttatgtgt gtttccgaat gttttagtta gccttttgggt ggagccgcca gctgacagga catcttaca gagaatttgc acatctcttg aagcttagca atcttattgc acactgttcg ctggaagctt tttgaagagc acattctcct cagttagctc atgaggtttt catttttatt cttccttcca acgtggtgct atctctgaaa cgagcgttag agtgccgcct tagacggagg caggagtctt gttagaaagc ggacgctgtt ctaaaaaagg tctcctgcag atctgtctgg gctgtgatga cgaatattat gaaatgtgcc ttttctgaag agattgtgtt agctccaaag cttttcctat cgcagtgttt cagttcttta ttttcccttg tggatatgct gtgtgaaccg tcgtgtgagt gtggtatgcc tgatcacaga tggattttgt tataagcatc aatgtgacac ttgcaggaca ctacaacgtg ggacattgtt tgtttcttcc atatttggaa gataaattta tgtgtagact tttttgtaag atacggttaa taactaaaat ttattgaaat ggtcttgcaa tgactcgtat tcagatgctt aaagaaagca ttgctgctac aaatatttct atttttagaa aggggtttta tggaccaatg cccagttgt cagtcagagc cgttggtgtt tttcattgtt taaaatgtca cctgtaaaat gggcattatt tatgtttttt tttttgcatt	1415 1475 1535 1595 1655 1715 1775 1835 1895 1955 2015 2075 2135
50	cctgataatt gtatgtattg tataaagaac gtctgtacat tgggttataa cactagtata tttaaaactta caggcttatt tgtaastgaa accaccattt taatgtactg taattaacat ggttataata cgtacaatcc ttccctcatc ccatcacaca actttttttg tgtgtgataa actgattttg gtttgcaata aaaccttgaa aaatattta	2195 2255 2315 2354

# 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 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

```

# 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			
15	Ala	Leu	Gly	Tyr	Leu	His	Ser	Leu	Asn	Ile	Val	Tyr	Arg	Asp	Leu	Lys
	210						215					220				
20	Pro	Glu	Asn	Ile	Leu	Leu	Asp	Ser	Gln	Gly	His	Ile	Val	Leu	Thr	Asp
	225					230					235					240
25	Phe	Gly	Leu	Cys	Lys	Glu	Asn	Ile	Glu	His	Asn	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr
				245						250					255	
30	Phe	Cys	Gly	Thr	Pro	Glu	Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Leu	His	Lys	Gln
				260					265					270		
35	Pro	Tyr	Asp	Arg	Thr	Val	Asp	Trp	Trp	Cys	Leu	Gly	Ala	Val	Leu	Tyr
			275					280					285			
40	Glu	Met	Leu	Tyr	Gly	Leu	Pro	Pro	Phe	Tyr	Ser	Arg	Asn	Thr	Ala	Glu
	290						295					300				
45	Met	Tyr	Asp	Asn	Ile	Leu	Asn	Lys	Pro	Leu	Gln	Leu	Lys	Pro	Asn	Ile
	305					310					315				320	
50	Thr	Asn	Ser	Ala	Arg	His	Leu	Leu	Glu	Gly	Leu	Leu	Gln	Lys	Asp	Arg
				325						330					335	
55	Thr	Lys	Arg	Leu	Gly	Ala	Lys	Asp	Asp	Phe	Met	Glu	Ile	Lys	Ser	His
				340				345						350		
60	Val	Phe	Phe	Ser	Leu	Ile	Asn	Trp	Asp	Asp	Leu	Ile	Asn	Lys	Lys	Ile
			355					360					365			
65	Thr	Pro	Pro	Phe	Asn	Pro	Asn	Val	Ser	Gly	Pro	Asn	Asp	Leu	Arg	His
	370						375					380				
70	Phe	Asp	Pro	Glu	Phe	Thr	Glu	Glu	Pro	Val	Pro	Asn	Ser	Ile	Gly	Lys
	385					390					395				400	
75	Ser	Pro	Asp	Ser	Val	Leu	Val	Thr	Ala	Ser	Val	Lys	Glu	Ala	Ala	Glu
				405						410					415	
80	Ala	Phe	Leu	Gly	Phe	Ser	Tyr	Ala	Pro	Pro	Thr	Asp	Ser	Phe	Leu	
				420					425					430		