(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 670 986**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)
C12Q 1/68 (2008.01)
G01N 33/86 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2008** **PCT/JP2008/059673**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2008** **WO08146797**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2008** **E 08764706 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018** **EP 2161335**

(54) Título: **Nuevo gen GPIIIa**

(30) Prioridad:

25.05.2007 JP 2007139642

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.06.2018

(73) Titular/es:

JAPANESE RED CROSS SOCIETY (50.0%)
1-3 SHIBADAIMON 1-CHOME MINATO-KU
TOKYO 105-8521, JP y
WAKUNAGA PHARMACEUTICAL CO., LTD (50.0%)

(72) Inventor/es:

TANIUE, ATSUKO;
ISHII, HIROYUKI;
MAEKAWAJIRI, SHINJI;
NAGATA, NOZOMI y
OKA, TAKANORI

(74) Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 670 986 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

Nuevo gen GPIIIa

CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a un nuevo gen GPIIIa que es un marcador para la determinación de púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune o el riesgo de desarrollarla. Más particularmente, la presente invención se refiere a un medio para detectar la mutación en el gen GPIIIa, un procedimiento de detección y un kit de detección de la mutación.

TÉCNICA ANTERIOR

[0002] Las plaquetas se adhieren a un sitio de angiopatía y a continuación se unen (agregan) entre sí para formar un trombo, y estas funciones están controladas por diversas proteínas existentes en la membrana de las plaquetas. Los ejemplos conocidos de tales proteínas de membrana incluyen GPI (glucoproteína I), GPIIb (glicoproteína IIb) y GPIIIa (glicoproteína IIIa). Con respecto a GPIIIa, el ADNc de longitud completa que codifica una proteína GPIIIa se aisló de plaquetas de un individuo normal, y se ha especificado su estructura de gen (J. Biol. Chem. 262 (9) pág. 3936-3939). Además, se han llevado a cabo investigaciones sobre antígenos plaquetarios existentes en estas proteínas de membrana (HPA-1 a 7) (J. Clin. Invest 40 P1597 (1961), Prog. Hematol. 4 P222 (1964), Vox Sang 4 P161 (1959), Vox Sang 39 p113 (1980)).

[0003] Los antígenos plaquetarios son conocidos como causas de la púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune (NAITP), púrpura postransfusional, refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetas, y similares. En los individuos japoneses, se dice que los anticuerpos anti-HPA-2b están involucrados en la refractariedad a terapia de transfusión de plaquetas y los anticuerpos anti-HPA-4b están involucrados en NAITP. Por lo tanto, la tipificación del tipo antígeno plaquetario se está convirtiendo en clínicamente importante.

[0004] Los tipos de antígenos plaquetarios se producen debido a los polimorfismos de varias glicoproteínas (Tabla 1), cuyos polimorfismos son producidos por la sustitución de un solo aminoácido a nivel de proteína o una sustitución de una sola base a nivel genético. Por lo tanto, en la tipificación del antígeno plaquetario basada en el gen, se evalúa tal diferencia de una sola base (Japanese Journal of Transfusion Medicine.Vol.No.1 39 (1): 204-211, 1993).

[Tabla 1]

Sistema de antígeno	Antígeno	Proteína de membrana de plaqueta	Sustitución de aminoácido	Codón
HPA-1	HPA-1a	GPIIIa	Leu (33)	CTG
	HPA-1b		Pro	CCG
HPA-2	HPA-2a	GPIb	Thu (145)	ACG
	HPA-2b		Met	ATG
HPA-3	HPA-3a	GPIIb	Ile (843)	ATC
	HPA-3b		Ser	AGC
HPA-4	HPA-4a	GPIIIa	Arg (143)	CGA
	HPA-4b		Gln	CAA
HPA-5	HPA-5a	GPIa	Glu (505)	GAG
	HPA-5b		Lys	AAG
HPA-6	HPA-6a	GPIIIa	Arg (489)	CGA, CGG
	HPA-6b		Gln	CAG
HPA-7	HPA-7a	GPIIIa	Pro (407)	CCC
	HPA-7b		Ala	GCC
HPA-8	HPA-8a	GPIIIa	Arg (636)	CGT
	HPA-8b		Cys	TGT
NaK^{a}	NaK^{a+}	CD36	Pro (90)	CCT
	NaK^{a-}		Ser	TCT

[0005] Sin embargo, también existen tipos de antígenos plaquetarios desconocidos, y no se ha logrado todavía una suficiente elucidación de los mismos. Con respecto a HPA-7, los únicos polimorfismos descritos hasta ahora son HPA-7a, en el que la base en la posición 1297 en el gen GPIIIa es citosina (el aminoácido en la posición 407 es prolina) y HPA-7b en el que la base en la posición 1297 en el gen es guanina (el aminoácido en la posición 407 es alanina) (Kuijpers et al Blood:. 81: 70-76, 1993).

[0006] Ko et al. (Journal of transfusión and cell therapy, vol. 53, página 220, 2007) describe además un nuevo alelo encontrado del sitio del exón 9 del gen GPIIIa en HPA-7 que corresponde a la posición 1297 y el aminoácido en la

posición 407. Sin embargo, Ko et al. no describen todas las mutaciones en la posición 1297, en particular no describen la mutación 1297 T.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

[0007] Los presentes inventores han encontrado un nuevo antígeno específico de plaquetas en un análisis de la púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune (NAITP). Específicamente, los presentes inventores han encontrado que el residuo de nucleótido en la posición 1297 existente en el exón 9 del gen GPIIIa, que normalmente es citosina, está sustituido de citosina a timina en un paciente que sufre de púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune. Además, los presentes inventores han encontrado que esta sustitución estaba involucrada en púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune (Ejemplo 1). La presente invención se basa en este hallazgo.

[0008] Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo gen y proteína GPIIIa mutados, medios para detectar la mutación en el gen y la proteína, un procedimiento de detección y un kit de detección de la mutación.

[0009] Según la presente invención, se proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos del gen GPIIIa, en el que el residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa (SEQ ID NO: 1) es un residuo de timina o un fragmento del mismo, que comprende el residuo timina y que tiene una longitud de al menos 10 bases (en lo sucesivo denominado "polinucleótido, según la presente invención").

[0010] Según la presente invención, se proporciona una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la proteína GPIIIa, en el que el residuo de aminoácido en la posición 407 de la proteína GPIIIa (SEQ ID NO: 2) es un residuo de serina, o un fragmento del mismo que comprende el residuo de serina, que tiene al menos 6 residuos de aminoácidos (en lo sucesivo denominado la "proteína, según la presente invención").

[0011] Según la presente descripción, se proporciona un cebador que puede hibridar con una secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o una secuencia complementaria de la misma, y que se usa para la amplificación, mediante un procedimiento de amplificación de ácido nucleico, de una región que comprende el residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa o el residuo que se empareja con el mismo (en lo sucesivo denominado "cebador según la presente descripción"). Este cebador está comprendido en un kit para detectar el polimorfismo 1297T según la presente invención.

[0012] Según la presente descripción, se proporciona un conjunto de cebadores que consiste en dos o más clases de los cebadores según la presente invención, que se utiliza para la amplificación, mediante un procedimiento de amplificación de ácido nucleico, de una región que comprende el residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa o el residuo que se empareja con el mismo (en lo sucesivo denominado "conjunto de cebadores según la presente descripción"). Este conjunto de cebadores está comprendido en un kit para detectar el polimorfismo 1297T según la invención.

[0013] Según la presente descripción, se proporciona una sonda que puede hibridar con una secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o una secuencia complementaria de la misma, y que se utiliza para la detección del residuo de timina en la posición 1297 de la gen GPIIIa (en lo sucesivo denominado la "sonda según la presente descripción"). Esta sonda está comprendida en un kit para detectar el polimorfismo 1297T según la invención.

[0014] Según la presente invención, se proporciona un anticuerpo contra la proteína o un fragmento de la misma según la presente invención (en lo sucesivo denominado el "anticuerpo según la presente invención"). Siendo dicho anticuerpo específico al residuo de aminoácido en la posición 407 de la proteína GPIIIa que es un residuo de serina.

[0015] Según la presente descripción, se proporciona un procedimiento para determinar púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune o el riesgo de desarrollarla, mediante la detección de la mutación en el gen GPIIIa, que comprende la etapa de detectar el resto de timina en la posición 1297 del gen GPIIIa usando el cebador, el conjunto de cebadores o la sonda según la presente invención.

[**0016**] Además, según la presente descripción, se proporciona un procedimiento para determinar púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune o el riesgo de desarrollarla, mediante la detección de la mutación del gen GPIIIa, que comprende una etapa de detectar el residuo serina en la posición 407 de la proteína GPIIIa usando el anticuerpo según la presente invención (en lo sucesivo, los dos procedimientos descritos anteriormente se denominan colectivamente el "primer procedimiento de la presente descripción").

[0017] Según la presente descripción, se proporciona un procedimiento para determinar la posibilidad de aparición de la refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetas en la transfusión de plaquetas, mediante la detección de la mutación del gen GPIIIa, que comprende la etapa de detectar el residuo de timina en la posición 1297 del gen GPIIIa usando el cebador, el conjunto de cebadores o la sonda según la presente invención.

[0018] Además, según la presente descripción, se proporciona un procedimiento para determinar la posibilidad de

aparición de la refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetas en la transfusión de plaquetas mediante la detección de la mutación del gen GPIIIa, que comprende la etapa de detectar el residuo serina en la posición 407 de la proteína GPIIIa usando el anticuerpo según la presente invención (en lo sucesivo, los dos procedimientos descritos anteriormente se denominan colectivamente el "segundo procedimiento de la presente descripción").

[**0019**] Según la presente invención, se proporciona un kit para determinar púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune o el riesgo de desarrollarla, que comprende al menos el cebador, el conjunto de cebadores, la sonda como se describen anteriormente o el anticuerpo según la presente invención.

[**0020**] Según la presente invención, se proporciona un kit para determinar la posibilidad de aparición de la refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetas en la transfusión de plaquetas, que comprende al menos el cebador, el conjunto de cebadores, la sonda como se describen anteriormente o el anticuerpo según la presente invención.

[**0021**] La sonda, el cebador, el conjunto de cebadores, tal como se describen anteriormente, o el anticuerpo según la presente invención se pueden utilizar como un marcador para la determinación la púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune o el riesgo de desarrollarla. Por lo tanto, la presente invención es útil para las pruebas genéticas para púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune y similares. Además, la sonda, el cebador, el conjunto de cebadores, tal como se describen anteriormente, o el anticuerpo según la presente invención se pueden utilizar como un marcador para determinar la posibilidad de aparición de la refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetas en la transfusión de plaquetas. Por lo tanto, la presente invención es útil para la predicción del efecto de transfusión en la transfusión de plaquetas y similares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[Gen mutado y proteína mutada]

[0022] El polinucleótido según la presente invención se puede utilizar como un ácido nucleico estándar marcado en la hibridación competitiva para la detección de la mutación del residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa (SEQ ID NO: 1), es decir, la sustitución al residuo de timina (en lo sucesivo, denominado el "polimorfismo 1297T del gen GPIIIa") (Ejemplo 1). Además, se puede utilizar como una secuencia de nucleótidos de una sonda de oligonucleótidos para su uso en la detección.

[**0023**] En la presente memoria, el "(residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa" significa el residuo de nucleótido situado en la posición 1297 contada desde el punto de partida, es decir, el primer residuo que es el residuo de adenina del codón de iniciación en la región que codifica un péptido señal en el gen GPIIIa.

[**0024**] Las posiciones 1 a 78 del gen GPIIIa constituyen la región que codifica un péptido señal, y las posiciones 79 a 2364 del gen GPIIIa constituyen la región que codifica una proteína madura.

[**0025]** El ácido nucleico estándar marcado para detectar el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa puede ser uno capaz de detectar la sustitución del residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa al residuo timina, y también puede ser un fragmento del polinucleótido según la presente invención. El fragmento del polinucleótido según la presente invención es, en particular, un fragmento de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos del gen GPIIIa, de la que el residuo de nucleótido en la posición 1297 es un residuo de timina, en el que el fragmento comprende el residuo de timina y tiene una longitud de por lo menos 10 bases.

[**0026**] El polinucleótido según la presente invención incluye un polinucleótido seleccionado de los siguientes (i), (ii), (iii) y (iv):
(i) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1;
(ii) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 en la que se insertan, se sustituyen y/o se eliminan uno o más nucleótidos y/o se añaden uno o más nucleótidos a uno o ambos de sus extremos, y que codifica una proteína funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (con la condición de que, en el polinucleótido, el residuo de nucleótido de la posición 1297 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 es un residuo de timina) ;
(iii) un polinucleótido que se hibrida, bajo condiciones rigurosas, con un polinucleótido que consiste en la secuencia complementaria de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, y que codifica una proteína funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 (con la condición de que, en el polinucleótido, el residuo de nucleótido correspondiente al residuo de nucleótido de la posición 1297 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 es un residuo de timina); y
(iv) un polinucleótido que tiene un 70% o más de identidad con un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, y que codifica una proteína funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (con la condición de que, en el polinucleótido, el residuo de nucleótido correspondiente al residuo de nucleótido de la posición 1297 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 es un residuo de timina).

[0027] La secuencia en las posiciones 1 a 78 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 es una secuencia que codifica un péptido señal (GenBank nº de acceso NM_000212). En la presente invención, la secuencia que codifica un péptido señal no está limitada a esta secuencia, siempre que pueda codificar un péptido capaz de funcionar como un péptido señal.

[0028] El polinucleótido según la presente invención es preferiblemente un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una parte de la misma que comprende el residuo de aminoácido en la posición 407 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[**0029**] En la presente invención, cuando se proporciona la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, las secuencias de nucleótidos que la codifican se pueden determinar fácilmente, y se pueden seleccionar varias secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0030] Por consiguiente, un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 también significa no sólo una parte de toda la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 1, una secuencia de ADN que codifica los mismos aminoácidos, que tiene un codón que tiene una relación de degeneración con la misma como una secuencia de ADN. La presente descripción incluye, además, las secuencias de ARN correspondientes a estas secuencias.

[0031] Un ejemplo preferido de un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 incluye un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1.

[**0032**] En la presente memoria, ya sea o no una proteína que es funcionalmente equivalente a la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, se puede determinar mediante la evaluación de los fenómenos biológicos o funciones relacionadas con la expresión de la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[**0033]** El polinucleótido según la presente invención es preferiblemente un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma que comprende el residuo de nucleótido en la posición 1297 de la SEQ ID NO: 1. El polinucleótido según la presente invención es más preferiblemente un polinucleótido que comprende al menos un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7 (secuencia de nucleótidos en las posiciones 1201 a 1391 en SEQ ID NO: 1). El polinucleótido según la presente invención es aún más preferiblemente un polinucleótido que comprende al menos un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 (secuencia de nucleótidos en las posiciones 1281 a 1320 en SEQ ID NO: 1).

[**0034**] La proteína según la presente invención se puede utilizar como un antígeno para la preparación de un anticuerpo capaz de detectar la mutación del residuo de aminoácido en la posición 407 de la proteína GPIIIa, es decir, la sustitución al residuo serina (en lo sucesivo, se denomina el "polimorfismo 407S de la proteína GPIIIa).

[0035] En la presente memoria, el "residuo de aminoácido en la posición 407 de la proteína GPIIIa" significa el residuo de aminoácido situado en la posición 407 contada desde el punto de partida, es decir, el primer residuo, que es el residuo de glicina en el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos que constituye la proteína GPIIIa madura.

[**0036**] La "proteína GPIIIa madura" indica una proteína codificada por la secuencia de nucleótidos en las posiciones 79 a 2364 del gen GPIIIa, que no comprende el péptido señal. Por ejemplo, es una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

[0037] La proteína según la presente invención incluye una proteína seleccionada de las siguientes (v), (vi), (vii) y (viii):
(v) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
(vi) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en la que se insertan, sustituyen y/o se eliminan uno o más aminoácidos y/o se añaden uno o más aminoácidos a uno o ambos de sus extremos, y que es funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (con la condición de que el residuo de aminoácido en la posición 407 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 es un residuo de serina);
(vii) una proteína que es codificada por un polinucleótido que hibrida, en condiciones rigurosas, con un polinucleótido que consiste en la secuencia complementaria de la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y que es funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (con la condición de que el residuo de aminoácido que corresponde al residuo aminoácido en la posición 407 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 es un residuo de serina); y
(viii) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene el 70% o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y que es funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (con la condición de que el residuo de aminoácido que corresponde al

residuo aminoácido en la posición 407 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 es un residuo de serina).

[0038] La proteína según la presente invención es preferiblemente una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma que comprende el residuo de aminoácido en la posición 407 de la SEQ ID NO: 2. La proteína según la presente invención es más preferiblemente una proteína (polipéptido) que comprende al menos un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (secuencia de aminoácidos en las posiciones 381 a 450 en la SEQ ID NO: 2). La proteína según la presente invención es aún más preferiblemente una proteína (polipéptido) que comprende al menos un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (secuencia de aminoácidos en las posiciones 395 a 420 en la SEQ ID NO: 2).

[**0039**] El antígeno para preparar un anticuerpo capaz de detectar el polimorfismo 407S de la proteína GPIIIa puede ser uno capaz de detectar la sustitución del residuo de aminoácido en la posición 407 en la proteína GPIIIa al residuo de serina, y también puede ser un fragmento de la proteína (péptido) según la presente invención. El fragmento de la proteína según la presente invención es, en particular, un fragmento de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la proteína GPIIIa de la que el residuo de aminoácido en la posición 407 es un residuo serina, en el que el fragmento comprende el residuo de serina.

[**0040**] El fragmento de la proteína según la presente invención es un polipéptido que tiene al menos 6 residuos de aminoácidos (por ejemplo, 8, 10, 12 15 o más residuos de aminoácidos).

[0041] En la presente invención, el "gen GPIIIa" es conocido como un gen que codifica una proteína de membrana de las plaquetas, y ha sido registrado con el Nº de Acceso de GenBank M35999 (SEQ ID NO: 5 (secuencia de bases), SEQ ID NO: 6 (secuencia de aminoácidos)) o el Nº de Acceso NM_000212.

[0042] El gen GPIIIa incluye no sólo el polinucleótido de la siguiente (I'), sino también un polinucleótido homólogo seleccionado de los siguientes (II'), (III') y (IV'):
(i') un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5;
(ii') un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 en la que se insertan, sustituyen y/o se eliminan uno o más nucleótidos y/o se añaden uno o más nucleótidos a uno o ambos de sus extremos, y que codifica una proteína funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;
(iii') un polinucleótido que se hibrida, bajo condiciones rigurosas, con un polinucleótido que consiste en la secuencia complementaria de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5, y que codifica una proteína funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; y
(iv') un polinucleótido que tiene el 70% o más de identidad con un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5, y que codifica una proteína funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

[**0043**] La secuencia en las posiciones 1 a 78 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 es una secuencia que codifica el péptido señal (GenBank de Nº de acceso NM_000212). En la presente invención, la secuencia que codifica el péptido señal no está limitada a esta secuencia, siempre que pueda codificar un péptido capaz de funcionar como un péptido señal.

[0044] El gen GPIIIa es preferiblemente un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5.

[0045] Además, el gen GPIIIa es preferiblemente un polinucleótido que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

[**0046**] Como proteína GPIIIa, además de la proteína de (v') a continuación, se proporcionan las proteínas (polipéptidos) homólogas seleccionadas de (vi'), (vii'), y (viii'):
(v') una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;
(vi') una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos como la SEQ ID NO: 6 en la que se insertan, sustituyen y/o se eliminan uno o más aminoácidos y/o se añaden uno o más aminoácidos a uno o ambos de sus extremos, y que es funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;
(vii') una proteína que es codificada por un polinucleótido que hibrida, en condiciones rigurosas, con un polinucleótido que consiste en la secuencia complementaria de una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y que es funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y
(viii') una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene el 70% o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y que es funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

[**0047]** La proteína GPIIIa es preferiblemente una proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID

NO: 5.

[0048] Además, como proteína GPIIIa, se proporciona más preferiblemente una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

[0049] En la presente memoria, "se insertan, sustituyen y/o se eliminan uno o más nucleótidos y/o se añaden uno o más nucleótidos a uno o ambos de sus extremos" y "se insertan, sustituyen y/o se eliminan uno o más aminoácidos y/o se añaden uno o más aminoácidos a uno o ambos de sus extremos " significa que la modificación se ha llevado a cabo mediante un procedimiento técnico bien conocido, tal como la mutagénesis dirigida al sitio, o por sustitución de una pluralidad de nucleótidos o aminoácidos en un grado en que se puede producir de forma natural. El número de nucleótidos o aminoácidos a modificar puede ser, por ejemplo, de 1 a 30, preferiblemente de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 10, aún más preferiblemente de 1 a 4, con especial preferencia de 1 a 2 inserciones, sustituciones o eliminaciones, y/o la adición o adiciones a uno o ambos de los extremos.

[0050] La secuencia de nucleótidos modificada del polinucleótido según la presente invención es una secuencia de nucleótidos modificada que no afecta el residuo de nucleótido de la posición 1297 del gen GPIIIa, y puede ser preferiblemente una secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención que tiene una o más (por ejemplo, una o varias, o 1, 2, 3 o 4) mutaciones que no afectan a las funciones de una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

[0051] La secuencia de nucleótidos modificada del gen GPIIIa puede ser preferiblemente una secuencia de nucleótidos del gen GPIIIa que tiene una o más (por ejemplo, una o varias, o 1, 2, 3 o 4) mutaciones que no afectan a las funciones de una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

[**0052]** La secuencia de aminoácidos modificada de la proteína según la presente invención es una secuencia de aminoácidos modificada que no afecta al residuo de aminoácido en la posición 407 de la proteína GPIIIa, y puede ser preferiblemente una secuencia de aminoácidos de la proteína según la presente invención que se muestra en la SEQ ID NO: 2 que tiene una o más (por ejemplo, una o varias, o 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservativas.

[**0053**] La secuencia de aminoácidos modificada de la proteína GPIIIa puede ser preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la proteína GPIIIa que se muestra en la SEQ ID NO: 6 que tiene una o más (por ejemplo, una o varias, o 1, 2, 3 o 4) sustituciones conservativas.

[0054] En la presente memoria, una "sustitución o sustituciones conservativa" significa que uno o más residuos de aminoácidos están sustituidos por un residuo o residuos de aminoácidos que son químicamente similares a los misms de tal manera que las funciones de la proteína no se modifican sustancialmente. Ejemplos de la misma incluyen los casos en que un determinado residuo hidrofóbico es sustituido por otro residuo hidrofóbico y los casos en que un determinado residuo polar se sustituye por otro residuo polar que tienen la misma carga eléctrica. Dicho aminoácido o aminoácidos funcionalmente similares que pueden ser sustituidos son conocidos en la técnica para cada aminoácido. Los ejemplos particulares de los mismos incluyen, como aminoácidos no polares (hidrófobos), alanina, valina, isoleucina, leucina, prolina, triptófano, fenilalanina y metionina. Los ejemplos de aminoácidos polares (neutros) incluyen glicina, serina, treonina, tirosina, glutamina, asparagina y cisteína. Los ejemplos de aminoácidos (básicos) que tienen carga positiva incluyen arginina, histidina y lisina. Los ejemplos de aminoácidos (ácidos) que tienen carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

[0055] En la presente memoria, "hibridar" significa hibridarse, en condiciones rigurosas, con un polinucleótido diana, mientras que no se hibride con nucleótidos distintos del nucleótido diana. Las "condiciones rigurosas" se pueden determinar en base a la temperatura de fusión (ºC) de la doble cadena formada por la secuencia de sonda o la secuencia de cebador y la cadena complementaria de la misma, la concentración de sal de la solución y similares. El establecimiento de condiciones rigurosas apropiadas después de seleccionar una secuencia de sonda o una secuencia de cebador es una técnica bien conocida para los expertos en la técnica (por ejemplo, Molecular Cloning 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)).

[0056] La hibridación se puede llevar a cabo según un procedimiento conocido. En los casos donde se utiliza una biblioteca disponible comercialmente, se puede llevar a cabo según el procedimiento descrito en las instrucciones del fabricante adjuntas al mismo.

[0057] En la presente memoria, el término "identificar" con respecto a una secuencia de bases o una secuencia de aminoácidos significa el grado de coincidencia, entre las secuencias que deben compararse, de las bases o residuos de aminoácidos que constituyen cada secuencia. El valor de cada "identificar" indicado en la presente memoria puede ser un valor calculado por un programa de búsqueda de homologías conocido por los expertos en la técnica, y se puede calcular fácilmente mediante FASTA, BLAST o similar usando el valor los parámetros por defecto (ajuste inicial).

[0058] Una secuencia de aminoácidos que tiene el 70% o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 puede ser una secuencia de aminoácidos que tiene preferiblemente 80% o más, más preferiblemente

85% o más, aún más preferiblemente 90% o más, aún más preferiblemente 95% o más, aún más preferiblemente 98% o más, y lo más preferiblemente 99% o más de identidad con la misma.

[0059] Una secuencia de aminoácidos que tiene el 70% o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 puede ser una secuencia de aminoácidos que tiene preferiblemente 80% o más, más preferiblemente 85% o más, aún más preferiblemente 90% o más, aún más preferiblemente 95% o más, aún más preferiblemente 98% o más, y lo más preferiblemente 99% o más de identidad con la misma.

[0060] En la presente invención, cuando se proporciona la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 se puede determinar fácilmente secuencias de nucleótidos que la codifican y se pueden seleccionar varias secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

[0061] Por consiguiente, un polinucleótido que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 también significa no sólo una parte de toda la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 5, una secuencia de ADN que codifica los mismos aminoácidos, que tiene un codón que tiene una relación de degeneración con la misma como una secuencia de ADN. La presente descripción incluye, además, las secuencias de ARN correspondientes a estas secuencias.

[0062] Un ejemplo preferido de un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 incluye un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.

[**0063**] En la presente memoria, ya sea o no una proteína que es funcionalmente equivalente a la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, se puede determinar mediante la evaluación de los fenómenos biológicos o funciones relacionadas con la expresión de la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

[0064] Según la presente invención, se proporciona un polinucleótido que consiste en una secuencia complementaria de una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos del gen GPIIIa, en el que el residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa es el residuo de timina, o un fragmento del mismo, que comprende el emparejamiento del residuo con el residuo de timina.

[Cebador y conjunto de cebadores]

[0065] El cebador según la presente descripción puede hibridar específicamente con el polinucleótido según la presente invención, para amplificar, mediante un procedimiento de amplificación de ácido nucleico, una región que comprende el residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa o el residuo que se empareja con el mismo con el mismo. Por lo tanto, el cebador según la presente descripción puede utilizarse como un marcador para la determinación de púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune o el riesgo de desarrollarla. Además, el cebador según la presente descripción puede utilizarse como un marcador para determinar la posibilidad de aparición de la refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetas en la transfusión de plaquetas.

[0066] El cebador según la presente descripción significa un compuesto de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) o similares, y preferiblemente uno compuesto de ADN.

[0067] El cebador según la presente descripción puede amplificar, mediante un procedimiento de amplificación de ácido nucleico, una región que comprende el residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa o el residuo que se empareja con el mismo en la secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o la secuencia complementaria de la misma. Ejemplos de los mismos incluyen los que consisten en un polinucleótido que tiene al menos 10, preferiblemente al menos 15, más preferiblemente al menos 20, aún más preferiblemente al menos 21 residuos de nucleótidos contiguos en la secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o la secuencia complementaria de la misma. Además, los ejemplos del cebador de la presente invención incluyen los que consisten en un polinucleótido que tiene de 10 a 30, 12 a 30, 15 a 30, 20 a 30, y 21 a 30 residuos de nucleótidos contiguos en una secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o una secuencia complementaria de la misma.

[0068] Además, el cebador según la presente descripción puede ser uno capaz de hibridar con una región que comprende el residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa o el residuo que se empareja con el mismo, en una secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o una secuencia complementaria de la misma.

[0069] En el presente documento, un polinucleótido que comprende nucleótidos contiguos en una secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o una secuencia complementaria de la misma puede funcionar como cebador según la presente descripción, y los ejemplos del mismo incluyen también un polinucleótido modificado que comprende nucleótidos contiguos en una secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o una secuencia complementaria de la misma en la que se introducen una o varias (por ejemplo,

1, 2, 3 o 4) mutaciones (que pueden seleccionarse, por ejemplo, de inserción, sustitución, deleción y adición), en la que la mutación no afecta al residuo de nucleótido de la posición 1297 del gen GPIIIa. Un ejemplo de un polinucleótido modificado incluye un polinucleótido que comprende al menos 12 a 30 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia complementaria de la misma que tiene una o varias mutaciones introducidas a la misma, y que funciona como el cebador según la presente descripción.

[0070] La longitud del cebador según la presente descripción puede ser de al menos 10 bases, y es preferiblemente de al menos 15 bases, más preferiblemente, de al menos 20 bases, aún más preferiblemente, de al menos 21 bases. Además, el cebador según la presente descripción tiene de 12 a 30 bases, de 20 a 30 bases, o de 21 a 30 bases de longitud.

[0071] Según la presente descripción, se proporciona un cebador que tiene una longitud de 12 a 30 bases que consiste en un polinucleótido que tiene al menos 10 (más preferiblemente al menos 15, aún más preferiblemente al menos 20, aún más preferiblemente al menos 21) nucleótidos contiguos de un nucleótido en una secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o una secuencia complementaria de la misma; que puede amplificar, mediante un procedimiento de amplificación de ácido nucleico, una región que comprende el residuo de nucleótido en la posición 1297 de una secuencia de nucleótidos del gen GPIIIa, y que es para utilizar en la detección del polimorfismo 1297T del gen GPIIIa.

[0072] El cebador según la presente descripción también pueden usarse como un conjunto de cebadores que comprende una combinación de dos o más clases de los cebadores según la presente descripción.

[0073] El conjunto de cebadores según la presente descripción se puede seleccionar de tal manera que una región que comprende el residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa o un residuo que se empareja con el mismo, en una secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o una secuencia complementaria de la misma, puede ser amplificada por un procedimiento de amplificación de ácido nucleico. Un procedimiento de amplificación de ácido nucleico es bien conocido y los expertos en la técnica pueden seleccionar un par de cebadores para la amplificación de un ácido nucleico según sea apropiado. Por ejemplo, en el procedimiento de PCR, los cebadores se pueden seleccionar de tal manera que uno de los dos cebadores se empareja con la cadena positiva del gen GPIIIa mutado, el otro cebador se empareja con la cadena negativa del gen GPIIIa mutado, y con una hebra extendida por un cebador que se empareja al otro cebador. Además, en el procedimiento LAMP (WO 00/28082), tres regiones del extremo 3', es decir, F3c, F2c y F1c, y tres regiones del extremo 5', es decir, B1, B2 y B3, se definen cada uno para un gen diana, cuyas seis regiones se pueden utilizar para el diseño de cuatro tipos de cebadores.

[0074] El cebador y el conjunto de cebadores según la presente descripción se pueden utilizar como un cebador y un conjunto de cebadores en un procedimiento de amplificación de ácido nucleico conocido, tal como un procedimiento de PCR (Saiki, RK, Bugawan, TL, et al. (1986) Nature, 324, 163-166), un procedimiento NASBA (Comptom, J. (1991) Nature, 650,91-92), un procedimiento TMA (Kacian, DL, y Fultz, TJ (1995) Patente de Estados Unidos 5.399.491), un procedimiento SDA (Walker, GT, Little, MC, et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 392-396) o un procedimiento de PCR-SSCP (Orita, M., Iwahara, H., et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 86, 2776-2770) según un procedimiento convencional.

[0075] Los cebadores según el presente procedimiento se pueden sintetizar químicamente en base a las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria. La preparación de un cebador es bien conocida, y puede llevarse a cabo según un procedimiento convencional.

[Sonda]

[0076] La sonda según la presente descripción se hibrida específicamente con el polinucleótido según la presente descripción, y puede detectar el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa. Por lo tanto, la sonda según la presente descripción puede utilizarse como un marcador para la determinación de púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune y/o el riesgo de desarrollarla. Además, la sonda según la presente descripción puede utilizarse como un marcador para determinar la posibilidad de aparición de la refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetas en la transfusión de plaquetas.

[0077] La sonda según la presente descripción significa que una que consiste en ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) o similares, y es preferiblemente una que consiste en ADN.

[0078] Un ejemplo de la sonda según la presente descripción incluye las que son capaces de hibridar con una región que comprende el residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa o el residuo que se empareja al mismo, en la secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o la secuencia complementaria de la misma.

[0079] Un ejemplo de la sonda según la presente descripción incluye las que consisten en un polinucleótido que comprende al menos 10, preferiblemente al menos 14, más preferiblemente al menos 15, aún más preferiblemente

al menos 16 residuos de nucleótidos contiguos en una secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o una secuencia complementaria de la misma. Además, un ejemplo de sonda de la presente descripción incluye las que consisten en un polinucleótido que comprende de 10 a 20, 12 a 20, 14 a 20, 15 a 20, y 16 a 20, 10 a 30, 12 a 30, 14 a 30, 15 a 30 o 16 a 30 residuos de nucleótidos contiguos en una secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o una secuencia complementaria de la misma.

[**0080]** En el presente documento, el polinucleótido que comprende los nucleótidos contiguos en una secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o una secuencia complementaria de la misma puede funcionar como la sonda según la presente descripción, y los ejemplos del mismo incluyen también un polinucleótido modificado que comprende los nucleótidos contiguos en una secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o una secuencia complementaria de la misma en la que se introducen una o varias (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) mutaciones (que pueden seleccionarse, por ejemplo, de inserción, sustitución, deleción y adición), en el que la mutación no afecta el residuo nucleótido de la posición 1297 del gen GPIIIa. Un ejemplo de un polinucleótido modificado incluye un polinucleótido que comprende al menos de 12 a 30 nucleótidos contiguos en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia complementaria de la misma que tiene 1 o varias mutaciones introducidas a la misma, y que funciona como la sonda según la presente descripción.

[0081] La longitud de la sonda según la presente descripción es de al menos 10 bases. Además, la longitud de la sonda según la presente descripción es de 12 a 30 bases.

[0082] Según la presente descripción, se proporciona una sonda y un cebador que tienen una longitud de 12 a 30 bases, que consiste en un polinucleótido que tiene al menos 10 (más preferiblemente al menos 15) nucleótidos contiguos en una secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o una secuencia complementaria de la misma, que se puede hibridar con una región que comprende el residuo de nucleótido en la posición 1297 de una secuencia de nucleótidos del gen GPIIIa, y que es para utilizar en la detección del polimorfismo 1297T del gen GPIIIa.

[0083] La sonda según la presente descripción puede usarse como sonda en un procedimiento conocido tal como un procedimiento de transferencia Northern, un procedimiento de transferencia Southern o un procedimiento de hibridación in situ, según un procedimiento convencional.

[0084] La sonda según la presente descripción se puede sintetizar químicamente basándose en una secuencia de nucleótidos descrita en la presente memoria. La preparación de un cebador es bien conocida y se puede llevar a cabo según un procedimiento convencional.

[Anticuerpo]

[0085] El anticuerpo según la presente invención puede reconocer específicamente la proteína según la presente invención y puede detectar el polimorfismo 407S de la proteína GPIIIa. Por lo tanto, el anticuerpo según la presente invención se puede utilizar como un marcador para la determinación de púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune o el riesgo de desarrollarla. Además, el anticuerpo según la presente invención se puede utilizar como un marcador para determinar la posibilidad de aparición de la refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetas en la transfusión de plaquetas.

[0086] Según una realización preferida del anticuerpo según la presente invención, se proporciona un anticuerpo que reconoce una región que comprende el residuo de aminoácido en la posición 407 de la proteína GPIIIa en una secuencia de aminoácidos de la proteína según la presente invención. Mediante el uso de dicho anticuerpo, se puede detectar el polimorfismo 407S de la proteína GPIIIa. Los ejemplos de dicho anticuerpo incluyen un anticuerpo contra una proteína que comprende al menos 6 residuos de aminoácidos que tienen el residuo de aminoácido en la posición 407 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0087] Un ejemplo de un anticuerpo contra la proteína según la presente invención incluye un anticuerpo contra una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una parte de la misma.

[0088] Un ejemplo de un anticuerpo según la presente invención incluye un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monocatenario (scFv), un anticuerpo humanizado, un anticuerpo poliespecífico y un fragmento de anticuerpo, tal como Fab, Fab', $F(ab')_2$ Fc y Fv.

[0089] El anticuerpo según la presente invención puede obtenerse utilizando un procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica.

[Procedimiento de detección]

[0090] La sustitución del residuo de nucleótido en la posición 1297 en la secuencia de nucleótidos del gen GPIIIa al residuo de timina puede ser un índice de púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune o el riesgo de desarrollarla. Por lo tanto, según la presente invención, la púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune o el riesgo de

desarrollarla se pueden determinar mediante la detección del polimorfismo 1297T del gen GPIIIa.

[0091] Existe la posibilidad de que el antígeno plaquetario (antígeno HPA-7) en el que el residuo de nucleótido en la posición 1297 en el gen GPIIIa está sustituido por el residuo de timina provoque la refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetas en la transfusión de plaquetas debido a la diferencia en el antígeno. Por lo tanto, la sustitución puede ser un índice de si tiene lugar o no la refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetase en la transfusión de plaquetas, es decir, un índice del efecto de la transfusión en la transfusión de plaquetas. De este modo, según la presente invención, la posibilidad de aparición de refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetas en la transfusión de plaquetas se puede determinar mediante la detección del polimorfismo 1297T del gen GPIIIa.

[0092] El procedimiento de detección según la presente descripción no está limitado con tal de que sea un procedimiento capaz de detectar el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa o el polimorfismo 407S de la proteína GPIIIa en una muestra de ensayo, y sus ejemplos incluyen un procedimiento de hibridación, un procedimiento de amplificación de ácido nucleico y un procedimiento de reacción antígeno-anticuerpo.

[0093] En el presente documento, la "muestra de ensayo" puede comprender una región que contiene el residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa o el residuo de aminoácido en la posición 407 de la proteína GPIIIa, y puede obtenerse por extracción del gen, ARNm o proteína de una persona a ensayar (sujeto). El ARNm puede convertirse a ADNc, según se requiera, antes de su uso. En la presente memoria, el "gen" también incluye dicho ADNc.

[0094] En el presente documento, el "sujeto" puede ser, además de un recién nacido, un pariente consanguíneo del recién nacido. La presente invención es ventajosa en el sentido de que el riesgo de desarrollar púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune puede determinarse prenatalmente.

[0095] El gen, el ARNm o la proteína del sujeto se pueden extraer de cualquier célula en el cuerpo, y las células son preferiblemente células de leucocitos.

[**0096**] Según la presente invención, el gen extraído o ARNm se puede someter como tal a un procedimiento de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (procedimiento RFLP) (Southerns, EM (1975) J. Mol. Biol. 98, 503), un procedimiento de sonda de oligonucleótido específica de alelo (procedimiento ASO) (Wallace, RB, Schaffer, NJ, et al. (1979) Nucleic Acid Res., 6, 3543) o un procedimiento de ensyao de ligación de oligonucleótidos, para detectar el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa.

[0097] Según el procedimiento de detección de la presente descripción, el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa en una muestra de ensayo se puede detectar mediante amplificación de una muestra de ácido nucleico (ARNm o un producto de transcripción inversa del mismo) mediante un procedimiento de amplificación de ácido nucleico usando el cebador o la conjunto de cebadores según la presente descripción y análisis del producto de amplificación.

[0098] La detección del polimorfismo 1297T del gen GPIIIa utilizando un procedimiento de amplificación de ácido nucleico puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, las siguientes etapas de:
(c) realizar un procedimiento de amplificación de ácido nucleico utilizando un polinucleótido derivado de una muestra de ensayo como plantilla y el cebador o el conjunto de cebadores según la presente descripción; y
(d) analizar un producto de amplificación formado.

[0099] En la etapa (c), el ARNm preparó a partir de la muestra de ensayo o el ADN complementario (ADNc) transcrito de forma inversa a partir del ARNm se pueden utilizar como plantilla.

[0100] La amplificación del gen se puede llevar a cabo utilizando un procedimiento de amplificación de ácido nucleico tal como un procedimiento de PCR (Saiki, RK, Bugawan, TL, et al. (1986) Nature, 324, 163-166), un procedimiento NASBA (Comptom, J. (1991) Nature, 650,91-92), un procedimiento TMA (Kacian, DL, y Fultz, TJ (1995) patente de Estados Unidos 5.399.491) o un procedimiento SDA (Walker, GT, Little, MC, et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 392-396).

[0101] Un gen amplificado por estos procedimientos se puede utilizar para detectar el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa dependiendo de las características del producto de amplificación. Por ejemplo, con un fragmento amplificado por el procedimiento de PCR, la scuencia de nucleótidos se puede determinar fácilmente mediante un procedimiento de determinación de la secuencia de base, y de ese modo, se puede determinar si el residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa es o no timina.

[0102] La amplificación del gen mediante PCR también se puede llevar a cabo utilizando un procedimiento de PCR-SSCP (Orita, M., Iwahara, H., et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2776-2770) que reconoce la diferencia de una base. Un procedimiento de PCR-SSCP es un procedimiento en el que el fragmento de ácido nucleico amplificado por PCR se desnaturaliza por calor para formar cadenas individuales, y se separa usando gel de poliacrilamida no desnaturalizante a una temperatura constante. El procedimiento puede detectar una diferencia de

una base mediante la evaluación, como la diferencia en la movilidad electroforética, de la diferencia en la formación de la estructura de orden superior debido a la diferencia de un fragmento de nucleótidos.

[**0103]** De otro modo, un fragmento amplificado por un procedimiento de PCR puede analizarse mediante un procedimiento de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (procedimiento RFLP) (Southerns, EM (1975) J. Mol. Biol. 98, 503), un procedimiento de sonda de oligonucleótido específica de alelo (procedimiento ASO) (Saiki, RK, Bugawan, TL, et al, (1986) Nature, 324, 163-166), un procedimiento de ensayo de ligación de oligonucleótidos (Landegren, U, Kaiser, R., et al. (1990) PCR Protocols, Academic Press, Inc. pág. 92-98), un procedimiento de PCR-PHFA (Oka, T., Matsunaga, H., et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1541-1547), un procedimiento de PCR-rSSO (Kawai, S., et al, (1994) Hum Immunol, 41 (2), 121-126) o similares. En los casos en que se tratan simultáneamente múltiples muestras, se prefiere un procedimiento de PCR-PHFA o un procedimiento de PCR-rSSO.

[**0104**] Según el procedimiento de detección de la presente invención, el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa en la muestra de ensayo se puede detectar mediante la amplificación de una muestra de ácido nucleico (ARNm o un producto de transcripción inversa del mismo), mediante un procedimiento de amplificación de ácido nucleico, usando el cebador o el conjunto de cebadores según la presente descripción, que se puede hibridar con una región que comprende el residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa o el residuo que se empareja con el mismo en una secuencia de nucleótidos del polinucleótido según la presente invención o una secuencia complementaria de la misma, y la detección del producto de amplificación.

[0105] Según el primer procedimiento según la presente descripción, el sujeto para el que se identifica el residuo de nucleótido de la posición 1297 como timina se le proporciona una evaluación de que se detecta el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa, y por lo tanto se puede diagnosticar o determinar que es un paciente con púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune o que tiene el riesgo de desarrollarla.

[**0106**] Según el segundo procedimiento según la presente descripción, el sujeto para el que se identifica el residuo de nucleótido de la posición 1297 como timina se le proporciona una evaluación de que se detecta el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa, y por lo tanto se puede diagnosticar o determinar que tiene posibilidades de desarrollar refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetas en la transfusión de plaquetas.

[0107] Según el procedimiento de detección de la presente descripción, el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa en una muestra de ensayo se puede detectar por hibridación de la sonda según la presente descripción con una muestra de ácido nucleico (ARNm o un producto de transcripción inversa del mismo) y la detección del complejo de hibridación, es decir, nucleótidos de doble cadena.

[0108] Para un procedimiento detallado de un procedimiento de hibridación, se puede hacer referencia a Nucleic Acid Hybridization Bios Scientific Publishers (1999).

[0109] La detección del polimorfismo 1297T del gen GPIIIa utilizando un procedimiento de hibridación puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, las siguientes etapas de:
(a) poner en contacto un polinucleótido derivado de una muestra de ensayo con la sonda según la presente invención; y
(b) detectar un complejo de hibridación.

[**0110**] En la etapa (a), el ARNm preparado a partir de la muestra de ensayo o el ADN complementario (ADNc) transcrito de forma inversa a partir del ARNm, como el polinucleótido derivado de la muestra de células a ensayar, puede ponerse en contacto con la sonda.

[0111] En el procedimiento de detección usando la sonda, la sonda puede estar marcada. Un ejemplo de un marcador incluye un marcador utilizando sustancias radiactivas, enzimas y sustancias fluorescentes.

[0112] La detección del producto de hibridación se puede llevar a cabo utilizando un procedimiento bien conocido tal como hibridación Northern, hibridación Southern o hibridación de colonias.

[0113] Según el primer procedimiento según la presente descripción, el sujeto para el que se identifica el residuo de nucleótido de la posición 1297 como timina se le proporciona una evaluación de que se detectó el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa, y por lo tanto se puede diagnosticar o determinar que es un paciente con púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune o que tiene el riesgo de desarrollarla.

[**0114**] Según el segundo procedimiento según la presente descripción, el sujeto para el que se identifica el residuo de nucleótido de la posición 1297 como timina se le proporciona una evaluación de que se detecta el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa, y por lo tanto se puede diagnosticar o determinar que tiene posibilidades de desarrollar refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetas en la transfusión de plaquetas.

[0115] Según el procedimiento de detección de la presente descripción, el polimorfismo 407S de la proteína GPIIIa

en la muestra de ensayo se puede detectar poniendo en contacto el anticuerpo según la presente invención con la muestra de ensayo y detectar la reacción antígeno-anticuerpo.

[0116] La detección del polimorfismo 407S de la proteína GPIIIa usando la reacción antígeno-anticuerpo se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante las siguientes etapas de:
(e) poner en contacto una proteína derivada de una muestra de ensayo con el anticuerpo según la presente invención; y
(f) detectar un complejo antígeno-anticuerpo.

[0117] Un procedimiento para detectar la reacción antígeno-anticuerpo es bien conocido para los expertos en la técnica y, por ejemplo, la proteína GPIIIa en una muestra de células a ensayar que se considera que comprende células precursoras de proliferación de neuronas productoras de dopamina, puede detectarse mediante un procedimiento inmunológico. Para el procedimiento inmunológico, se puede aplicar un procedimiento previamente conocido, tal como un procedimiento de tinción inmunohistológica, un inmunoensayo enzimático, un procedimiento de transferencia Western, un procedimiento de aglutinación, un procedimiento de competición o un procedimiento sándwich, a la muestra de células sometidas a un tratamiento adecuado según la necesidad, tal como la separación de células y operación de extracción. El procedimiento de tinción immunohistológica puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, un procedimiento directo usando un anticuerpo marcado o un procedimiento indirecto utilizando un anticuerpo marcado contra el anticuerpo. Para un agente de marcaje, se puede utilizar una sustancia de marcaje conocida, tal como una sustancia fluorescente, una sustancia radiactiva, una enzima, un metal y un colorante.

[0118] Según el primer procedimiento según la presente descripción, al sujeto en el que se detecta el complejo antígeno-anticuerpo se proporciona la evaluación de que se detecta el polimorfismo 407S de la proteína GPIIIa, y por lo tanto se puede diagnosticar o determinar que es un paciente con púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune o que tiene el riesgo de desarrollarla.

[0119] Según el segundo procedimiento según la presente descripción, al sujeto en el que se detecta el complejo antígeno-anticuerpo se proporciona la evaluación de que se detecta el polimorfismo 407S de la proteína GPIIIa, y por lo tanto se puede diagnosticar o determinae que tiene posibilidades de desarrollar refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetas en la transfusión de plaquetas.

[Kit de detección]

[0120] Según la presente invención, se proporciona un kit para llevar a cabo el procedimiento de detección según la presente invención.

[0121] Un ejemplo de un kit de detección para llevar a cabo el procedimiento de detección según la presente invención incluye un kit para detectar el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa, que comprende al menos la sonda, el cebador o el conjunto de cebadores según la presente descripción. Además, un ejemplo de un kit de detección para llevar a cabo el procedimiento de detección según la presente invención incluye un kit para detectar el polimorfismo 407S de la proteína GPIIIa, que comprende al menos el anticuerpo según la presente invención.

[0122] La sonda, cebador, conjunto de cebadores y anticuerpo según la presente descripción pueden ser aquellos marcados.

[0123] El kit de detección según la presente invención que comprende al menos la sonda según la presente descripción detecta el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa mediante el procedimiento de hibridación.

[0124] El kit según la presente invención puede comprender, además, si se desea, varios reactivos para llevar a cabo el procedimiento de hibridación, tal como un compuesto sustrato utilizado para la detección del marcador; un tampón de hibridación; una instrucción; y/o un instrumento.

[0125] El kit de detección según la presente descripción que comprende al menos el cebador según la presente invención o el conjunto de cebadores según la presente descripción detecta la expresión del gen GPIIIa mediante un procedimiento de amplificación de ácido nucleico.

[**0126]** El kit según la presente invención puede comprender, además, si se desea, varios reactivos para llevar a cabo el procedimiento de amplificación de ácido nucleico, tal como un tampón; un patrón interno que indica que la PCR puede proceder normalmente; una instrucción; y/o un instrumento.

[**0127**] El kit de detección según la presente invención que comprende al menos el anticuerpo según la presente invención detecta el polimorfismo 407S de la proteína GPIIIa mediante la detección de una reacción antígeno-anticuerpo.

[0128] El kit según la presente invención puede comprender, además, según la tercera descripción del

procedimiento de detección, varios reactivos para llevar a cabo una reacción de antígeno-anticuerpo, tal como un anticuerpo secundario utilizado para el procedimiento de ELISA o similar; un reactivo colorante; un tampón; una instrucción; y/o un instrumento.

EJEMPLOS

[0129] La presente invención se describirá ahora concretamente por medio de Ejemplos, pero la presente invención, por ejemplo, la secuencia del cebador, la secuencia de la sonda y similares, no está limitada a las mismas.

Ejemplo 1: Relación entre el polimorfismo en el gen GPIIIa (HPA-7) y púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune

[**0130**] Con respecto al niño afectado diagnosticado como púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune (NAITP), se esperaba que el anticuerpo contenido en el suero materno reaccione con las plaquetas en el niño afectado. Dado que el niño afectado fue un segundo hijo, se considera que la madre, que se sensibilizó al antígeno específico de plaquetas derivado del padre durante el embarazo del primer hijo, adquirió la producibilidad de anticuerpos contra este antígeno, y las plaquetas del niño afectado fueron atacadas por el anticuerpo producido durante el embarazo del segundo hijo. Dado que el antígeno específico de plaquetas del niño afectado deriva del padre, se confirmó la reactividad de los sueros del niño afectado y su madre contra las plaquetas del padre mediante el procedimiento MPHA (Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy, Vol. 52. No.6 52 (6) 678-683, 2006).

[**0131]** En primer lugar, las plaquetas del padre se inmovilizaron sobre pocillos de una microplaca, cuyas plaquetas se sometieron a continuación a reacciones con los sueros del niño afectado y la madre, y diluyentes de los mismos. Los productos resultantes se hicieron reaccionar con eritrocitos de oveja revestidos con el anticuerpo IgG humano, y se observaron las imágenes resultantes de agregación.

[0132] Como resultado, el suero de la madre y el suero del niño afectado, que eran hasta 1024 veces y 16 veces diluidos, respectivamente, mostraron reacciones positivas contra las plaquetas del padre.

[**0133**] Posteriormente, se analizaron los tipos de los genes de antígenos plaquetarios utilizando el procedimiento PCR-PHFA (WO98 / 02574).

[**0134**] Como resultado, se observaron incompatibilidades ya que, entre los antígenos plaquetarios, con respecto a HPA-2, la madre tenía (a-b+), el padre tenía (a+b-) y el niño afectado tenía (a+b+); y, con respecto a HPA-3, la madre tenía (a+b-), y el padre y el niño afectado tenían (a+b+). Sin embargo, con respecto a los tipos de antígenos plaquetarios de HPA-1, 4, 5 y 6, se observaron compatibilidades, ya que los padres y el niño afectado ambos tenían (a+b-). Por otro lado, con respecto a HPA-7, se reveló que el gen de HPA-7a está presente, mientras que el gen de HPA-7b está ausente en todos aquellos individuos en comparación con los ADN estándar previamente descritos para HPA-7a y HPA-7b mediante el procedimiento de PHFA.

[0135] El antígeno específico de plaquetas derivado del padre se considera que existe en el niño afectado. Por lo tanto, se comprobaron las reactividades de las plaquetas del padre contra los anticuerpos conocidos, y las plaquetas fueron negativas contra los anticuerpos de HPA-1 a HPA-6, mientras que mostraron una reactividad contra el anticuerpo de HPA-7b. Aquí, dado que las plaquetas del padre reaccionaron con el anticuerpo de HPA-7b, se esperaba una cierta sustitución de bases en una región correspondiente a HPA-7 dentro del gen GPIIIa. En vista de esto, el exón 9 del gen GPIIIa en el ADN cromosómico del padre se amplificó usando los siguientes cebadores y el producto de amplificación se purificó usando Wizard Plus SV Gel y el sistema de PCR Clean, seguido de su ligación en el vector pT7Blue-T (fabricado por Novagen) y la introducción en la cepa JM109 de E. coli (fabricada por TAKARA).
WHPA7-A: 5'-TCCAGAGCTGGAGTGTTAACTG (SEQ ID NO: 9)
WHPA7-B: 5'-CTGGCAGGCACAGTCACAATC (SEQ ID NO: 10)

[0136] Las colonias de color blanco obtenidas se cultivaron y los plásmidos fueron entonces purificados, seguido de la secuenciación usando el cebador M13-R18 (fabricado por TAKAEA) para confirmar la secuencia de bases de la región clonada. La secuenciación se llevó a cabo utilizando el terminador BigDye versión 1.1 (fabricado por Applied Biosystems). Los resultados de la secuenciación fueron como se muestra en la Tabla 2. HPA-7a indica el gen de HPA-7a, HPA-7b indica el gen de HPA-7b, y HPA-7new indica un nuevo gen diferente del gen de HPA-7a y del gen de HPA-7b.

[Tabla 2]

```
            1201                                    1220                                    1240
HPA-7a      C A G A G C T G G A G T G T T A A C T G G G C C C A A C T G T G T C T A A A T A
HPA-7b      C A G A G C T G G A G T G T T A A C T G G G C C C A A C T G T G T C T A A A T A
HPA-7new    C A G A G C T G G A G T G T T A A C T G G G C C C A A C T G T G T C T A A A T A

            1241                                    1260                                    1280
HPA-7a      C A A T C T T T C T T T C C A T C C A G G T G A G C T T C A G C A T T G A G G C
HPA-7b      C A A T C T T T C T T T C C A T C C A G G T G A G C T T C A G C A T T G A G G C
HPA-7new    C A A T C T T T C T T T C C A T C C A G G T G A G C T T C A G C A T T G A G G C

            1281                                1297    1300                                    1320
HPA-7a      C A A G G T G C G A G G C T G T C C C A G G A G A A G G A G A A G T C C T T T
HPA-7b      C A A G G T G C G A G G C T G T G C C C A G G A G A A G G A G A A G T C C T T T
HPA-7new    C A A G G T G C G A G G C T G T T C C C A G G A G A A G G A G A A G T C C T T T

            1321                                    1340                                    1360
HPA-7a      A C C A T A A A G C C C G T G G G C T T C A A G G A C A G C C T G A T C G T C C
HPA-7b      A C C A T A A A G C C C G T G G G C T T C A A G G A C A G C C T G A T C G T C C
HPA-7new    A C C A T A A A G C C C G T G G G C T T C A A G G A C A G C C T G A T C G T C C

            1361                                    1380
HPA-7a      A G G T C A C C T T T G A T T G G A C T G T G C C T G C C A G
HPA-7b      A G G T C A C C T T T G A T T G G A C T G T G C C T G C C A G
HPA-7new    A G G T C A C C T T T G A T T G G A C T G T G C C T G C C A G
```

[Tabla 3]

	381									390										400							407			410
HPA-7a	Trp	Ala	Gln	Leu	Cys	Leu	Asn	Thr	Ile	Phe	Leu	Ser	Ile	Gln	Val	Ser	Phe	Ser	Ile	Glu	Ala	Lys	Val	Arg	Gly	Cys	Pro	Gln	Glu	Lys
HPA-7b	Trp	Ala	Gln	Leu	Cys	Leu	Asn	Thr	Ile	Phe	Leu	Ser	Ile	Gln	Val	Ser	Phe	Ser	Ile	Glu	Ala	Lys	Val	Arg	Gly	Cys	Ala	Gln	Glu	Lys
HPA-7new	Trp	Ala	Gln	Leu	Cys	Leu	Asn	Thr	Ile	Phe	Leu	Ser	Ile	Gln	Val	Ser	Phe	Ser	Ile	Glu	Ala	Lys	Val	Arg	Gly	Cys	Ser	Gln	Glu	Lys

	411									420										430										440
HPA-7a	Glu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ile	Lys	Pro	Val	Gly	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ile	Val	Gln	Val	Thr	Phe	Asp	Cys	Asp	Cys	Ala	Cys	Gln	Ala	Gln
HPA-7b	Glu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ile	Lys	Pro	Val	Gly	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ile	Val	Gln	Val	Thr	Phe	Asp	Cys	Asp	Cys	Ala	Cys	Gln	Ala	Gln
HPA-7new	Glu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ile	Lys	Pro	Val	Gly	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ile	Val	Gln	Val	Thr	Phe	Asp	Cys	Asp	Cys	Ala	Cys	Gln	Ala	Gln

	441									450
HPA-7a	Ala	Glu	Pro	Asn	Ser	His	Arg	Cys	Asn	Asn
HPA-7b	Ala	Glu	Pro	Asn	Ser	His	Arg	Cys	Asn	Asn
HPA-7new	Ala	Glu	Pro	Asn	Ser	His	Arg	Cys	Asn	Asn

[0137] Como se muestra en la Tabla 2 y la Tabla 3, se confirmó el gen (HPA-7new) en el que la base en la posición 1297 del gen GPIIIa es timina y el aminoácido en la posición 407 de la proteína producida a partir de este gen es serina (SEQ ID NO: 7 (secuencia de bases), SEQ ID NO: 8 (secuencia de aminoácidos)). Con respecto al gen de HPA-7, como polimorfismos genéticos, se ha descrito hasta ahora el gen de HPA-7a en el que la base en la posición 1297 del gen GPIIIa es citosina y el aminoácido en la posición 407 es prolina, y el gen de HPA-7b en el que la base en la posición 1297 del gen GPIIIa es guanina y el aminoácido en la posición 407 es alanina, pero el gen confirmado esta vez se confirmó que tenía una nueva secuencia diferente de éstas.

Ejemplo 2: Construcción del sistema de detección para nuevo alelo de HPA-7 mediante el procedimientos de PCR-PHFA

[0138] A continuación, se describirá la construcción de un sistema de detección para el nuevo alelo de HPA-7 mediante el procedimiento de PCR-PHFA. En el procedimiento de PHFA, el producto obtenido mediante amplificación de la muestra utilizando cebadores no marcados (ADN de la muestra) y el producto obtenido mediante la amplificación de la misma región utilizando cebadores marcados (ADN estándar) se mezclaron juntos y se desnaturalizaron con calor, y se analizó si las secuencias del ADN de la muestra y el ADN estándar son o no idénticas en base al grado de sustitución de la cadena que se produce tras la hibridación bajo un gradiente de temperaturas.

(1) Preparación de los ADN estándar marcados

[0139] Se amplificaron los plásmidos a los que se incorporaron respectivamente el gen de HPA-7a, el gen de HPA-7b y el nuevo alelo (HPA-7new) confirmados en el Ejemplo 1 utilizando los siguientes cebadores, para preparar productos de PCR de los cuales un extremo se marcó con DNP (dinitrofenilo) y el otro extremo se marcó con biotina, cuyos productos se utilizaron como ADN estándar para HPA-7a, HPA-7b y HPA-7new, respectivamente.
DNP-WHPA7-A: 5'-TCCAGAGCTGGAGTGTTAACTG (SEQ ID NO: 11)
biotina-WHPA7-B: 5'-CTGGCAGGCACAGTCACAATC (SEQ ID NO: 12)

(2) Preparación del ADN de muestra

[0140] Se amplificaron los plásmidos a los que se incorporaron respectivamente HPA-7a, HPA-7b y HPA-7new mediante PCR usando los siguientes cebadores no marcados para obtener los ADN de muestra. Además, se amplificaron los ADN cromosómicos de los cuales se conocían los genotipos de antemano con los mismos cebadores para obtener los ADN de muestra.
WHPA7-A: 5'-TCCAGAGCTGGAGTGTTAACTG (SEQ ID NO: 9)
WHPA7-B: 5'-CTGGCAGGCACAGTCACAATC (SEQ ID NO: 10)

(3) Hibridación competitiva

[0141] Con 30 µl de 3 x SSC (concentración final), 1 µl de un ADN estándar que tenía marcadores en ambos extremos y 20 µl de un ADN de muestra se mezclaron, y la mezcla resultante se calentó a 98ºC durante 10 minutos, para desnaturalizar los ADN en cadenas sencillas. La mezcla se enfrió gradualmente a 70ºC a una velocidad de 1ºC/10 minutos para la hibridación. En este momento, las cadenas complementarias que tenían la secuencia completamente coincidente se reconstruyeron preferiblemente en comparación con las que tenían desapareamientos. Es decir, en los casos en que la muestra de ADN tiene completamente la misma secuencia que el ADN estándar, los marcadores en ambos extremos del ADN estándar matemáticamente se diluyen, de manera que se espera que la proporción de moléculas que tienen ambos marcadores sea de aproximadamente 1/21 del total. Por el contrario, en los casos en que la misma secuencia que el ADN estándar está ausente en el ADN de muestra, se reconstruyó preferiblemente el ADN estándar original que tenía los marcadores en ambos extremos.

(4) Detección de ADN estándar reconstruido

[0142] En un pocillo de una microplaca revestida con antelación con estreptavidina, se añadió el ADN estándar que tenía los marcadores en ambos extremos, cuyo ADN se conservó en el pocillo a través de la biotina en el extremo terminal. Mediante la adición de fosfatasa alcalina marcada con un anticuerpo anti-DNP a la misma, se espera que la fosfatasa alcalina se capture en el pocillo a través del ADN estándar. La adición de pNPP (paranitrofenol), que es un sustrato de esta enzima, causó el revelado de color amarillo. Este color se cuantificó y se detectó midiendo la absorbancia a 405 nm. En los casos en que la misma secuencia que el ADN estándar está presente en un ADN de muestra, la absorbancia es baja, mientras que en los casos en que la misma secuencia está ausente, la absorbancia es alta. Con respecto al valor de índice, la absorbancia medida para cada ADN estándar mezclado con agua se definió como 100, y se mostró la proporción de la absorbancia medida después de la mezcla con cada muestra, la desnaturalización con calor y el gradiente de temperaturas. En los casos en que este valor no es más de 20, la muestra se califica que es positiva contra el ADN estándar, y en los casos en que el valor no es menor que 20, la muestra se califica que es negativa.

[0143] Para los ADN estándar preparados a partir de los genes de HPA-7a, HPA-7b y HPA-7new, se midió el valor

del índice mostrado por cada muestra de ADN. Los resultados fueron como se indica en

Tabla 4

ADN de muestra	ADN estándar					
	A405			Índice		
	HPA-7a	HPA-7b	HPA-7new	HPA-7a	HPA-7b	HPA-7new
Control positivo	0,897	0,984	1,060	100	100	100
HPA-7a	0,049	0,529	0,661	5	54	62
HPA-7b	0,407	0,046	0,695	45	5	66
HPA-7new	0,577	0,659	0,050	64	67	5
HPA-7a/b	0,095	0,069	0,618	11	7	58
No, 1	0,052	0,543	0,681	6	55	64
No, 2	0,101	0,533	0,135	11	54	13
No, 3	0,062	0,572	0,705	7	58	67
No, 4	0,059	0,535	0,642	7	54	61
No, 5	0,066	0,520	0,637	7	53	60
No, 6	0,040	0,484	0,586	4	49	55
No, 7	0,039	0,467	0,603	4	47	57

[0144] Los ADN de muestra preparados a partir de los plásmidos en la que se clonaron los genes respectivos mostraron valores bajos del índice contra sus respectivos ADN estándar.

[0145] Aquí, los valores de índice en las muestras Nº 1 y Nº 3 a Nº 7 no eran más de 20 contra HPA-7a, mientras que mostraron valores superiores a 50 contra HPA-7b y HPA-7new, de manera que se supuso que tenían el genotipo homocigótico de HPA-7a. Por otra parte, la muestra No. 2 mostró valores del índice de no más de 20 contra los ADN estándar de HPA-7a y HPA-7new, de manera que se supuso que tenían el genotipo heterocigótico de HPA-7a/new.

[**0146]** A partir de los resultados anteriores, se demostró que el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa se puede detectar utilizando el procedimiento de PCR-PHFA.

Ejemplo 3: Construcción del procedimiento para la detección de un nuevo alelo mediante el procedimiento de microesferas fluorescentes

[0147] A continuación se describirá la construcción de un procedimiento para la detección del nuevo alelo HPA-7 mediante el procedimiento de microesferas fluorescentes. En el procedimiento de microesferas fluorescentes (Clin Chem. 43 (9) pág. 1799-801 (1997)), se pueden identificar 100 clases de microesferas mediante la coloración de las microesferas con dos tipos de colorantes fluorescentes, de manera que se consiguen 10 gradaciones para cada colorante. Mediante la inmovilización de diferentes sondas en las respectivas microesferas y la realización de la hibridación con ADN de muestra, se detectan simultáneamente las reactividades contra las múltiples sondas de ADN en el ensayo.

(1) Amplificación de genes

[0148] Se sometió un ADN cromosómico humano a amplificación por PCR usando los siguientes cebadores según un procedimiento convencional.
Biotina-P6/7FC: 5'-CCATCCAGGTGAGCTTCAGC (SEQ ID NO: 13)
Biotina-P6/7RC-2: 5'-AGTGGTTGCAGGTATATGAGGG (SEQ ID NO: 14)

(2) Preparación de microesferas Luminex

[0149] Como secuencias de sondas, se inmovilizaron oligonucleótidos que tenían las siguientes secuencias de nucleótidos sobre microesferas Luminex (fabricadas por Luminex) según un procedimiento convencional.
Microesferas No. 1 (microesferas para la detección de HPA-7a): 5'-GCTGTCCCCAGGAG-3' (SEQ ID NO: 15)
Microesferas No. 2 (microesferas para la detección de HPA-7b): 5'-GAGGCTGTGCCCAGGA-3' (SEQ ID NO: 16)
Microesferas No. 3 (microesferas para la detección de HPA-7new): 5'-GAGGCTGTTCCCAGG-3' (SEQ ID NO: 17)
Microesferas No. 4 (microesferas comunes para la detección de HPA-7): 5'-TGAACCTAATAGCCATCGC-3' (SEQ ID NO: 18)

(3) Hibridación y detección

[0150] Como muestras, se utilizaran los siguientes.
Muestra No. 1: un plásmido que tiene el gen de HPA-7a

Muestra No. 2: un plásmido que tiene el gen de HPA-7b
Muestra No. 3: una muestra de plásmido que tiene el gen de HPA-7new
Muestra No. 4: un ADN cromosómico No. 001
Muestra No. 5: un ADN cromosómico No. 019
Muestra No. 6: un ADN cromosómico No. 193

[0151] Mediante el uso de éstas como muestras, se llevaron a cabo la amplificación por PCR y la hibridación con las sondas, y se midieron los valores de fluorescencia de los productos de PCR capturados por las sondas unidas a las microesferas.

[**0152]** En primer lugar, se mezclaron 5 µl de la solución de reacción de PCR con 5 µl de solución alcalina para desnaturalizar el ADN en cadenas sencillas. La mezcla resultante se neutralizó mediante la mezcla con 25 µl de una solución de hibridación que contenía los cuatro tipos anteriores de microesferas y estreptavidina marcada con fluorescencia (fabricada por BD Biosciences). La mezcla resultante se incubó a 55ºC durante 30 minutos para la hibridación de las sondas con el producto de PCR, y se llevó a cabo el marcaje con fluorescencia del producto de PCR. Posteriormente, después de la adición de una solución de lavado y el mezclado de la mezcla resultante, se eliminó el sobrenadante por centrifugación para eliminar los productos de la PCR no unidos a las sondas y el exceso de estreptavidina marcada con fluorescencia. Las microesferas se suspendieron en la solución de lavado, y se llevó a cabo la identificación de los productos de PCR marcados con fluorescencia con la sonda en las microesferas y se llevaron a cabo cuatro tipos de microesferas utilizando el aparato Luminex. Los resultados de la detección fueron como se muestran en la Tabla 5.

[Tabla 5]

Muestra No.	Microesferas No.			
	Microesferas No. 1	Microesferas No. 2	Microesferas No. 3	Microesferas No. 4
Muestra No. 1	7466	47	78	5503
Muestra No. 2	69	12067	1649	5985
Muestra No. 3	128	594	12190	5929
Muestra No. 4	10017	79	217	7504
Muestra No. 5	9611	83	142	7836
Muestra No. 6	5355	174	9324	6054

[**0153**] Con respecto a los valores de fluorescencia, estableciendo el valor de corte en 2000, las células coloreadas se consideraban positivas. Dado que la muestra No. 1, la muestra nNo. 2 y la muestra No. 3 son plásmidos que tienen las secuencias de HPA-7a, HPA-7b y HPA-7new, respectivamente, reaccionaron específicamente con sus respectivas sondas, para dar valores de fluorescencia superiores el valor de corte. Además, todos reaccionaron con las microesferas No. 4 que tenían la secuencia común que la sonda, para dar altos valores de fluorescencia. Por otro lado, dado que las muestras No. 4 y No. 5, que son ADN cromosómicos, dieron altos valores de fluorescencia contra las microesferas que se unen con HPA-1a y la secuencia común, se puede observar que tiene HPA-7a homocigoto. Dado que la muestra No. 6 dio altos valores de fluorescencia contra las microesferas que se unen con HPA-7a, HPA-7new y la secuencia común, se puede observar que tiene HPA-7a y HPA-7new heterocigotos.

[0154] A partir de los resultados anteriores, se demostró que el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa se puede detectar mediante el uso del procedimiento de microesferas fluorescentes.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0155]

```
<110>  Japanese Red Cross Society Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd.

<120>  un nuevo gen GPIIIa

<130>  173651PX

<150>  JP 2007-139642
<151>  2007-05-25

<160>  18

<170>  PatentIn version 3.4

<210>  1
<211>  4469
<212>  ADN
```

<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (79)..(2364)

<400> 1
atgcgagcgc ggccgcggcc ccggccgctc tgggtgactg tgctggcgct gggggcgctg 60
gcgggcgttg gcgtagga ggg ccc aac atc tgt acc acg cga ggt gtg agc 111
Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser
1 5 10
tcc tgc cag cag tgc ctg gct gtg agc ccc atg tgt gcc tgg tgc tct 159
Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser
15 20 25
gat gag gcc ctg cct ctg ggc tca cct cgc tgt gac ctg aag gag aat 207
Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn
30 35 40
ctg ctg aag gat aac tgt gcc cca gaa tcc atc gag ttc cca gtg agt 255
Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser
45 50 55
gag gcc cga gta cta gag gac agg ccc ctc agc gac aag ggc tct gga 303
Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser Asp Lys Gly Ser Gly
60 65 70 75
gac agc tcc cag gtc act caa gtc agt ccc cag agg att gca ctc cgg 351
Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln Arg Ile Ala Leu Arg
80 85 90
ctc cgg cca gat gat tcg aag aat ttc tcc atc caa gtg cgg cag gtg 399
Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile Gln Val Arg Gln Val
95 100 105
gag gat tac cct gtg gac atc tac tac ttg atg gac ctg tct tac tcc 447
Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser
110 115 120
atg aag gat gat ctg tgg agc atc cag aac ctg ggt acc aag ctg gcc 495
Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu Gly Thr Lys Leu Ala
125 130 135
acc cag atg cga aag ctc acc agt aac ctg cgg att ggc ttc ggg gca 543
Thr Gln Met Arg Lys Leu Thr Ser Asn Leu Arg Ile Gly Phe Gly Ala
140 145 150 155
ttt gtg gac aag cct gtg tca cca tac atg tat atc tcc cca cca gag 591
Phe Val Asp Lys Pro Val Ser Pro Tyr Met Tyr Ile Ser Pro Pro Glu
160 165 170
gcc ctc gaa aac ccc tgc tat gat atg aag acc acc tgc ttg ccc atg 639
Ala Leu Glu Asn Pro Cys Tyr Asp Met Lys Thr Thr Cys Leu Pro Met
175 180 185
ttt ggc tac aaa cac gtg ctg acg cta act gac cag gtg acc cgc ttc 687
Phe Gly Tyr Lys His Val Leu Thr Leu Thr Asp Gln Val Thr Arg Phe
190 195 200
aat gag gaa gtg aag aag cag agt gtg tca cgg aac cga gat gcc cca 735
Asn Glu Glu Val Lys Lys Gln Ser Val Ser Arg Asn Arg Asp Ala Pro
205 210 215
gag ggt ggc ttt gat gcc atc atg cag gct aca gtc tgt gat gaa aag 783
Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met Gln Ala Thr Val Cys Asp Glu Lys
220 225 230 235
att ggc tgg agg aat gat gca tcc cac ttg ctg gtg ttt acc act gat 831
Ile Gly Trp Arg Asn Asp Ala Ser His Leu Leu Val Phe Thr Thr Asp
240 245 250
gcc aag act cat ata gca ttg gac gga agg ctg gca ggc att gtc cag 879
Ala Lys Thr His Ile Ala Leu Asp Gly Arg Leu Ala Gly Ile Val Gln
255 260 265
cct aat gac ggg cag tgt cat gtt ggt agt gac aat cat tac tct gcc 927
Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Val Gly Ser Asp Asn His Tyr Ser Ala
270 275 280
tcc act acc atg gat tat ccc tct ttg ggg ctg atg act gag aag cta 975
Ser Thr Thr Met Asp Tyr Pro Ser Leu Gly Leu Met Thr Glu Lys Leu
285 290 295
tcc cag aaa aac atc aat ttg atc ttt gca gtg act gaa aat gta gtc 1023
Ser Gln Lys Asn Ile Asn Leu Ile Phe Ala Val Thr Glu Asn Val Val
300 305 310 315

aat ctc tat cag aac tat agt gag ctc atc cca ggg acc aca gtt ggg 1071
Asn Leu Tyr Gln Asn Tyr Ser Glu Leu Ile Pro Gly Thr Thr Val Gly
320 325 330
gtt ctg tcc atg gat tcc agc aat gtc ctc cag ctc att gtt gat gct 1119
Val Leu Ser Met Asp Ser Ser Asn Val Leu Gln Leu Ile Val Asp Ala
335 340 345
tat ggg aaa atc cgt tct aaa gtc gag ctg gaa gtg cgt gac ctc cct 1167
Tyr Gly Lys Ile Arg Ser Lys Val Glu Leu Glu Val Arg Asp Leu Pro
350 355 360
gaa gag ttg tct cta tcc ttc aat gcc acc tgc ctc aac aat gag gtc 1215
Glu Glu Leu Ser Leu Ser Phe Asn Ala Thr Cys Leu Asn Asn Glu Val
365 370 375
atc cct ggc ctc aag tct tgt atg gga ctc aag att gga gac acg gtg 1263
Ile Pro Gly Leu Lys Ser Cys Met Gly Leu Lys Ile Gly Asp Thr Val
380 385 390 395
agc ttc agc att gag gcc aag gtg cga ggc tgt tcc cag gag aag gag 1311
Ser Phe Ser Ile Glu Ala Lys Val Arg Gly Cys Ser Gln Glu Lys Glu
400 405 410
aag tcc ttt acc ata aag ccc gtg ggc ttc aag gac agc ctg atc gtc 1359
Lys Ser Phe Thr Ile Lys Pro Val Gly Phe Lys Asp Ser Leu Ile Val
415 420 425
cag gtc acc ttt gat tgt gac tgt gcc tgc cag gcc caa gct gaa cct 1407
Gln Val Thr Phe Asp Cys Asp Cys Ala Cys Gln Ala Gln Ala Glu Pro
430 435 440
aat agc cat cgc tgc aac aat ggc aat ggg acc ttt gag tgt ggg gta 1455
Asn Ser His Arg Cys Asn Asn Gly Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Val
445 450 455
tgc cgt tgt ggg cct ggc tgg ctg gga tcc cag tgt gag tgc tca gag 1503
Cys Arg Cys Gly Pro Gly Trp Leu Gly Ser Gln Cys Glu Cys Ser Glu
460 465 470 475
gag gac tat cgc cct tcc cag cag gac gag tgc agc ccc cgg gag ggt 1551
Glu Asp Tyr Arg Pro Ser Gln Gln Asp Glu Cys Ser Pro Arg Glu Gly
480 485 490
cag ccc gtc tgc agc cag cgg ggc gag tgc ctc tgt ggt caa tgt gtc 1599
Gln Pro Val Cys Ser Gln Arg Gly Glu Cys Leu Cys Gly Gln Cys Val
495 500 505
tgc cac agc agt gac ttt ggc aag atc acg ggc aag tac tgc gag tgt 1647
Cys His Ser Ser Asp Phe Gly Lys Ile Thr Gly Lys Tyr Cys Glu Cys
510 515 520
gac gac ttc tcc tgt gtc cgc tac aag ggg gag atg tgc tca ggc cat 1695
Asp Asp Phe Ser Cys Val Arg Tyr Lys Gly Glu Met Cys Ser Gly His
525 530 535
ggc cag tgc agc tgt ggg gac tgc ctg tgt gac tcc gac tgg acc ggc 1743
Gly Gln Cys Ser Cys Gly Asp Cys Leu Cys Asp Ser Asp Trp Thr Gly
540 545 550 555
tac tac tgc aac tgt acc acg cgt act gac acc tgc atg tcc agc aat 1791
Tyr Tyr Cys Asn Cys Thr Thr Arg Thr Asp Thr Cys Met Ser Ser Asn
560 565 570
ggg ctg ctg tgc agc ggc cgc ggc aag tgt gaa tgt ggc agc tgt gtc 1839
Gly Leu Leu Cys Ser Gly Arg Gly Lys Cys Glu Cys Gly Ser Cys Val
575 580 585
tgt atc cag ccg ggc tcc tat ggg gac acc tgt gag aag tgc ccc acc 1887
Cys Ile Gln Pro Gly Ser Tyr Gly Asp Thr Cys Glu Lys Cys Pro Thr
590 595 600
tgc cca gat gcc tgc acc ttt aag aaa gaa tgt gtg gag tgt aag aag 1935
Cys Pro Asp Ala Cys Thr Phe Lys Lys Glu Cys Val Glu Cys Lys Lys
605 610 615
ttt gac cgg gga gcc cta cat gac gaa aat acc tgc aac cgt tac tgc 1983
Phe Asp Arg Gly Ala Leu His Asp Glu Asn Thr Cys Asn Arg Tyr Cys
620 625 630 635
cgt gac gag att gag tca gtg aaa gag ctt aag gac act ggc aag gat 2031
Arg Asp Glu Ile Glu Ser Val Lys Glu Leu Lys Asp Thr Gly Lys Asp
640 645 650
gca gtg aat tgt acc tat aag aat gag gat gac tgt gtc gtc aga ttc 2079
Ala Val Asn Cys Thr Tyr Lys Asn Glu Asp Asp Cys Val Val Arg Phe
655 660 665
cag tac tat gaa gat tct agt gga aag tcc atc ctg tat gtg gta gaa 2127
Gln Tyr Tyr Glu Asp Ser Ser Gly Lys Ser Ile Leu Tyr Val Val Glu

```
            670                 675                 680
gag cca gag tgt ccc aag ggc cct gac atc ctg gtg gtc ctg ctc tca     2175
Glu Pro Glu Cys Pro Lys Gly Pro Asp Ile Leu Val Val Leu Leu Ser
    685                 690                 695
gtg atg ggg gcc att ctg ctc att ggc ctt gcc gcc ctg ctc atc tgg     2223
Val Met Gly Ala Ile Leu Leu Ile Gly Leu Ala Ala Leu Leu Ile Trp
700                 705                 710                 715
aaa ctc ctc atc acc atc cac gac cga aaa gaa ttc gct aaa ttt gag     2271
Lys Leu Leu Ile Thr Ile His Asp Arg Lys Glu Phe Ala Lys Phe Glu
                720                 725                 730
gaa gaa cgc gcc aga gca aaa tgg gac aca gcc aac aac cca ctg tat     2319
Glu Glu Arg Ala Arg Ala Lys Trp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr
            735                 740                 745
aaa gag gcc acg tct acc ttc acc aat atc acg tac cgg ggc act         2364
Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr
        750                 755                 760
taatgataag cagtcatcct cagatcatta tcagcctgtg ccaggattgc aggagtccct   2424
gccatcatgt ttacagagga cagtatttgt ggggagggat ttcggggctc agagtggggt   2484
aggttgggag aatgtcagta tgtggaagtg tgggtctgtg tgtgtgtatg tgggggtctg   2544
tgtgtttatg tgtgtgtgtt gtgtgtggga gtgtgtaatt taaaattgtg atgtgtcctg   2604
ataagctgag ctccttagcc tttgtcccag aatgcctcct gcagggattc ttcctgctta   2664
gcttgagggt gactatggag ctgagcaggt gttcttcatt acctcagtga gaagccagct   2724
ttcctcatca ggccattgtc cctgaagaga agggcagggc tgaggcctct cattccagag   2784
gaagggacac caagccttgg ctctaccctg agttcataaa tttatggttc tcaggcctga   2844
ctctcagcag ctatggtagg aactgctggc ttggcagccc gggtcatctg tacctctgcc   2904
tcctttcccc tccctcaggc cgaaggagga gtcagggaga gctgaactat tagagctgcc   2964
tgtgcctttt gccatcccct caacccagct atggttctct cgcaagggaa gtccttgcaa   3024
gctaattctt tgacctgttg ggagtgagga tgtctgggcc actcaggggt cattcatggc   3084
ctgggggatg taccagcatc tcccagttca taatcacaac ccttcaaaga tttgccttat   3144
tggcagctct actctggagg tttgtttaga agaagtgtgt cacccttagg ccagcaccat   3204
ctctttacct cctaattcca caccctcact gctgtagaca tttgctatga cctggggatg   3264
tctctcatga ccaaatgctt ttcctcaaag ggagagagtg ctattgtaga gccagaggtc   3324
tggccctatg cttccggcct cctgtccctc atccatagca cctccacata cctggccctg   3384
agccttggtg tgctgtatcc atccatgggg ctgattgtat ttaccttcta cctcttggct   3444
gccttgtgaa ggaattattc ccatgagttg gctgggaata agtgccagga tggaatgatg   3504
ggtcagttgt atcagcacgt gtggcctgtt cttctatggg ttacaacctc atttaactca   3564
gtctttaatc tgagaggcca cagtgcaatt ttattttatt tttctcatga tgaggttttc   3624
ttaacttaaa agaacatgta tataaacatg cttgcattat atttgtaaat ttatgtgtat   3684
ggcaaagaag gagagcatag gaaaccacac agacttgggc agggtacaga cactcccact   3744
tggcatcatt cacagcaagt cactggccag tggctggatc tgtgaggggc tctctcatga   3804
tagaaggcta tggggataga tgtgtggaca cattggacct ttcctgagga agagggactg   3864
ttcttttgtc ccagaaaagc agtggctcca ttggtgttga catacatcca acattaaaag   3924
ccacccccaa atgcccaaga aaaaaagaaa gacttatcaa catttgttcc atgagcagaa   3984
aactggagct ctggcctcag tgttacagct aaataatctt taattaaggc aagtcacttt   4044
cttcttctta aagctgtttc tagtttgaga aatgatggga ttttagcagc cagtcttgaa   4104
ggtctctttc agtatcaaca ttctaagatg ctgggactta ctgtgtcatc aaatgtgcgg   4164
ttaagattct ctgggatatt gatactgttt gtgtttttag ttgggagatc tgagagacct   4224
ggctttggca agagcagatg tcattccata tcacctttct caatgaaagt ctcattctat   4284
cctctctcca aacccgtttt ccaacatttg ttaatagtta cgtctctcct gatgtagcac   4344
ttaagcttca tttagttatt atttctttct tcactttgca cacatttgca tccacatatt   4404
agggaaggaa taagtagctg caaactatct attcctgtat tattgtgtta acattgagat   4464
aaacc                                                               4469

<210>  2
<211>  762
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  2
Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys
1               5                   10                  15
Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro
            20                  25                  30
Leu Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn
        35                  40                  45
Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu
    50                  55                  60
Glu Asp Arg Pro Leu Ser Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val
```

65 70 75 80
Thr Gln Val Ser Pro Gln Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp
85 90 95
Ser Lys Asn Phe Ser Ile Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val
100 105 110
Asp Ile Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu
115 120 125
Trp Ser Ile Gln Asn Leu Gly Thr Lys Leu Ala Thr Gln Met Arg Lys
130 135 140
Leu Thr Ser Asn Leu Arg Ile Gly Phe Gly Ala Phe Val Asp Lys Pro
145 150 155 160
Val Ser Pro Tyr Met Tyr Ile Ser Pro Pro Glu Ala Leu Glu Asn Pro
165 170 175
Cys Tyr Asp Met Lys Thr Thr Cys Leu Pro Met Phe Gly Tyr Lys His
180 185 190
Val Leu Thr Leu Thr Asp Gln Val Thr Arg Phe Asn Glu Glu Val Lys
195 200 205
Lys Gln Ser Val Ser Arg Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp
210 215 220
Ala Ile Met Gln Ala Thr Val Cys Asp Glu Lys Ile Gly Trp Arg Asn
225 230 235 240
Asp Ala Ser His Leu Leu Val Phe Thr Thr Asp Ala Lys Thr His Ile
245 250 255
Ala Leu Asp Gly Arg Leu Ala Gly Ile Val Gln Pro Asn Asp Gly Gln
260 265 270
Cys His Val Gly Ser Asp Asn His Tyr Ser Ala Ser Thr Thr Met Asp
275 280 285
Tyr Pro Ser Leu Gly Leu Met Thr Glu Lys Leu Ser Gln Lys Asn Ile
290 295 300
Asn Leu Ile Phe Ala Val Thr Glu Asn Val Val Asn Leu Tyr Gln Asn
305 310 315 320
Tyr Ser Glu Leu Ile Pro Gly Thr Thr Val Gly Val Leu Ser Met Asp
325 330 335
Ser Ser Asn Val Leu Gln Leu Ile Val Asp Ala Tyr Gly Lys Ile Arg
340 345 350
Ser Lys Val Glu Leu Glu Val Arg Asp Leu Pro Glu Glu Leu Ser Leu
355 360 365
Ser Phe Asn Ala Thr Cys Leu Asn Asn Glu Val Ile Pro Gly Leu Lys
370 375 380
Ser Cys Met Gly Leu Lys Ile Gly Asp Thr Val Ser Phe Ser Ile Glu
385 390 395 400
Ala Lys Val Arg Gly Cys Ser Gln Glu Lys Glu Lys Ser Phe Thr Ile
405 410 415
Lys Pro Val Gly Phe Lys Asp Ser Leu Ile Val Gln Val Thr Phe Asp
420 425 430
Cys Asp Cys Ala Cys Gln Ala Gln Ala Glu Pro Asn Ser His Arg Cys
435 440 445
Asn Asn Gly Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Val Cys Arg Cys Gly Pro
450 455 460
Gly Trp Leu Gly Ser Gln Cys Glu Cys Ser Glu Glu Asp Tyr Arg Pro
465 470 475 480
Ser Gln Gln Asp Glu Cys Ser Pro Arg Glu Gly Gln Pro Val Cys Ser
485 490 495
Gln Arg Gly Glu Cys Leu Cys Gly Gln Cys Val Cys His Ser Ser Asp
500 505 510
Phe Gly Lys Ile Thr Gly Lys Tyr Cys Glu Cys Asp Asp Phe Ser Cys
515 520 525
Val Arg Tyr Lys Gly Glu Met Cys Ser Gly His Gly Gln Cys Ser Cys
530 535 540
Gly Asp Cys Leu Cys Asp Ser Asp Trp Thr Gly Tyr Tyr Cys Asn Cys
545 550 555 560
Thr Thr Arg Thr Asp Thr Cys Met Ser Ser Asn Gly Leu Leu Cys Ser
565 570 575
Gly Arg Gly Lys Cys Glu Cys Gly Ser Cys Val Cys Ile Gln Pro Gly
580 585 590
Ser Tyr Gly Asp Thr Cys Glu Lys Cys Pro Thr Cys Pro Asp Ala Cys
595 600 605
Thr Phe Lys Lys Glu Cys Val Glu Cys Lys Lys Phe Asp Arg Gly Ala

610 615 620
Leu His Asp Glu Asn Thr Cys Asn Arg Tyr Cys Arg Asp Glu Ile Glu
625 630 635 640
Ser Val Lys Glu Leu Lys Asp Thr Gly Lys Asp Ala Val Asn Cys Thr
645 650 655
Tyr Lys Asn Glu Asp Asp Cys Val Val Arg Phe Gln Tyr Tyr Glu Asp
660 665 670
Ser Ser Gly Lys Ser Ile Leu Tyr Val Val Glu Glu Pro Glu Cys Pro
675 680 685
Lys Gly Pro Asp Ile Leu Val Val Leu Leu Ser Val Met Gly Ala Ile
690 695 700
Leu Leu Ile Gly Leu Ala Ala Leu Leu Ile Trp Lys Leu Leu Ile Thr
705 710 715 720
Ile His Asp Arg Lys Glu Phe Ala Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala Arg
725 730 735
Ala Lys Trp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser
740 745 750
Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr
755 760

<210> 3
<211> 40
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 3
caaggtgcga ggctgttccc aggagaagga gaagtccttt 40

<210> 4
<211> 26
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Val Ser Phe Ser Ile Glu Ala Lys Val Arg Gly Cys Ser Gln Glu Lys
1 5 10 15
Glu Lys Ser Phe Thr Ile Lys Pro Val Gly
20 25

<210> 5
<211> 4469
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (79)..(2364)

<400> 5
atgcgagcgc ggccgcggcc ccggccgctc tgggtgactg tgctggcgct gggggcgctg 60
gcgggcgttg gcgtagga ggg ccc aac atc tgt acc acg cga ggt gtg agc 111
Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser
1 5 10
tcc tgc cag cag tgc ctg gct gtg agc ccc atg tgt gcc tgg tgc tct 159
Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser
15 20 25
gat gag gcc ctg cct ctg ggc tca cct cgc tgt gac ctg aag gag aat 207
Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn
30 35 40
ctg ctg aag gat aac tgt gcc cca gaa tcc atc gag ttc cca gtg agt 255
Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser
45 50 55
gag gcc cga gta cta gag gac agg ccc ctc agc gac aag ggc tct gga 303
Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser Asp Lys Gly Ser Gly
60 65 70 75
gac agc tcc cag gtc act caa gtc agt ccc cag agg att gca ctc cgg 351
Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln Arg Ile Ala Leu Arg
80 85 90

ctc cgg cca gat gat tcg aag aat ttc tcc atc caa gtg cgg cag gtg 399
Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile Gln Val Arg Gln Val
95 100 105
gag gat tac cct gtg gac atc tac tac ttg atg gac ctg tct tac tcc 447
Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser
110 115 120
atg aag gat gat ctg tgg agc atc cag aac ctg ggt acc aag ctg gcc 495
Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu Gly Thr Lys Leu Ala
125 130 135
acc cag atg cga aag ctc acc agt aac ctg cgg att ggc ttc ggg gca 543
Thr Gln Met Arg Lys Leu Thr Ser Asn Leu Arg Ile Gly Phe Gly Ala
140 145 150 155
ttt gtg gac aag cct gtg tca cca tac atg tat atc tcc cca cca gag 591
Phe Val Asp Lys Pro Val Ser Pro Tyr Met Tyr Ile Ser Pro Pro Glu
160 165 170
gcc ctc gaa aac ccc tgc tat gat atg aag acc acc tgc ttg ccc atg 639
Ala Leu Glu Asn Pro Cys Tyr Asp Met Lys Thr Thr Cys Leu Pro Met
175 180 185
ttt ggc tac aaa cac gtg ctg acg cta act gac cag gtg acc cgc ttc 687
Phe Gly Tyr Lys His Val Leu Thr Leu Thr Asp Gln Val Thr Arg Phe
190 195 200
aat gag gaa gtg aag aag cag agt gtg tca cgg aac cga gat gcc cca 735
Asn Glu Glu Val Lys Lys Gln Ser Val Ser Arg Asn Arg Asp Ala Pro
205 210 215
gag ggt ggc ttt gat gcc atc atg cag gct aca gtc tgt gat gaa aag 783
Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met Gln Ala Thr Val Cys Asp Glu Lys
220 225 230 235
att ggc tgg agg aat gat gca tcc cac ttg ctg gtg ttt acc act gat 831
Ile Gly Trp Arg Asn Asp Ala Ser His Leu Leu Val Phe Thr Thr Asp
240 245 250
gcc aag act cat ata gca ttg gac gga agg ctg gca ggc att gtc cag 879
Ala Lys Thr His Ile Ala Leu Asp Gly Arg Leu Ala Gly Ile Val Gln
255 260 265
cct aat gac ggg cag tgt cat gtt ggt agt gac aat cat tac tct gcc 927
Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Val Gly Ser Asp Asn His Tyr Ser Ala
270 275 280
tcc act acc atg gat tat ccc tct ttg ggg ctg atg act gag aag cta 975
Ser Thr Thr Met Asp Tyr Pro Ser Leu Gly Leu Met Thr Glu Lys Leu
285 290 295
tcc cag aaa aac atc aat ttg atc ttt gca gtg act gaa aat gta gtc 1023
Ser Gln Lys Asn Ile Asn Leu Ile Phe Ala Val Thr Glu Asn Val Val
300 305 310 315
aat ctc tat cag aac tat agt gag ctc atc cca ggg acc aca gtt ggg 1071
Asn Leu Tyr Gln Asn Tyr Ser Glu Leu Ile Pro Gly Thr Thr Val Gly
320 325 330
gtt ctg tcc atg gat tcc agc aat gtc ctc cag ctc att gtt gat gct 1119
Val Leu Ser Met Asp Ser Ser Asn Val Leu Gln Leu Ile Val Asp Ala
335 340 345
tat ggg aaa atc cgt tct aaa gtc gag ctg gaa gtg cgt gac ctc cct 1167
Tyr Gly Lys Ile Arg Ser Lys Val Glu Leu Glu Val Arg Asp Leu Pro
350 355 360
gaa gag ttg tct cta tcc ttc aat gcc acc tgc ctc aac aat gag gtc 1215
Glu Glu Leu Ser Leu Ser Phe Asn Ala Thr Cys Leu Asn Asn Glu Val
365 370 375
atc cct ggc ctc aag tct tgt atg gga ctc aag att gga gac acg gtg 1263
Ile Pro Gly Leu Lys Ser Cys Met Gly Leu Lys Ile Gly Asp Thr Val
380 385 390 395
agc ttc agc att gag gcc aag gtg cga ggc tgt ccc cag gag aag gag 1311
Ser Phe Ser Ile Glu Ala Lys Val Arg Gly Cys Pro Gln Glu Lys Glu
400 405 410
aag tcc ttt acc ata aag ccc gtg ggc ttc aag gac agc ctg atc gtc 1359
Lys Ser Phe Thr Ile Lys Pro Val Gly Phe Lys Asp Ser Leu Ile Val
415 420 425
cag gtc acc ttt gat tgt gac tgt gcc tgc cag gcc caa gct gaa cct 1407
Gln Val Thr Phe Asp Cys Asp Cys Ala Cys Gln Ala Gln Ala Glu Pro
430 435 440
aat agc cat cgc tgc aac aat ggc aat ggg acc ttt gag tgt ggg gta 1455
Asn Ser His Arg Cys Asn Asn Gly Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Val

```
    445                 450                 455
tgc cgt tgt ggg cct ggc tgg ctg gga tcc cag tgt gag tgc tca gag     1503
Cys Arg Cys Gly Pro Gly Trp Leu Gly Ser Gln Cys Glu Cys Ser Glu
460                 465                 470                 475
gag gac tat cgc cct tcc cag cag gac gag tgc agc ccc cgg gag ggt     1551
Glu Asp Tyr Arg Pro Ser Gln Gln Asp Glu Cys Ser Pro Arg Glu Gly
                480                 485                 490
cag ccc gtc tgc agc cag cgg ggc gag tgc ctc tgt ggt caa tgt gtc     1599
Gln Pro Val Cys Ser Gln Arg Gly Glu Cys Leu Cys Gly Gln Cys Val
            495                 500                 505
tgc cac agc agt gac ttt ggc aag atc acg ggc aag tac tgc gag tgt     1647
Cys His Ser Ser Asp Phe Gly Lys Ile Thr Gly Lys Tyr Cys Glu Cys
        510                 515                 520
gac gac ttc tcc tgt gtc cgc tac aag ggg gag atg tgc tca ggc cat     1695
Asp Asp Phe Ser Cys Val Arg Tyr Lys Gly Glu Met Cys Ser Gly His
    525                 530                 535
ggc cag tgc agc tgt ggg gac tgc ctg tgt gac tcc gac tgg acc ggc     1743
Gly Gln Cys Ser Cys Gly Asp Cys Leu Cys Asp Ser Asp Trp Thr Gly
540                 545                 550                 555
tac tac tgc aac tgt acc acg cgt act gac acc tgc atg tcc agc aat     1791
Tyr Tyr Cys Asn Cys Thr Thr Arg Thr Asp Thr Cys Met Ser Ser Asn
                560                 565                 570
ggg ctg ctg tgc agc ggc cgc ggc aag tgt gaa tgt ggc agc tgt gtc     1839
Gly Leu Leu Cys Ser Gly Arg Gly Lys Cys Glu Cys Gly Ser Cys Val
            575                 580                 585
tgt atc cag ccg ggc tcc tat ggg gac acc tgt gag aag tgc ccc acc     1887
Cys Ile Gln Pro Gly Ser Tyr Gly Asp Thr Cys Glu Lys Cys Pro Thr
        590                 595                 600
tgc cca gat gcc tgc acc ttt aag aaa gaa tgt gtg gag tgt aag aag     1935
Cys Pro Asp Ala Cys Thr Phe Lys Lys Glu Cys Val Glu Cys Lys Lys
    605                 610                 615
ttt gac cgg gga gcc cta cat gac gaa aat acc tgc aac cgt tac tgc     1983
Phe Asp Arg Gly Ala Leu His Asp Glu Asn Thr Cys Asn Arg Tyr Cys
620                 625                 630                 635
cgt gac gag att gag tca gtg aaa gag ctt aag gac act ggc aag gat     2031
Arg Asp Glu Ile Glu Ser Val Lys Glu Leu Lys Asp Thr Gly Lys Asp
                640                 645                 650
gca gtg aat tgt acc tat aag aat gag gat gac tgt gtc gtc aga ttc     2079
Ala Val Asn Cys Thr Tyr Lys Asn Glu Asp Asp Cys Val Val Arg Phe
            655                 660                 665
cag tac tat gaa gat tct agt gga aag tcc atc ctg tat gtg gta gaa     2127
Gln Tyr Tyr Glu Asp Ser Ser Gly Lys Ser Ile Leu Tyr Val Val Glu
        670                 675                 680
gag cca gag tgt ccc aag ggc cct gac atc ctg gtg gtc ctg ctc tca     2175
Glu Pro Glu Cys Pro Lys Gly Pro Asp Ile Leu Val Val Leu Leu Ser
    685                 690                 695
gtg atg ggg gcc att ctg ctc att ggc ctt gcc gcc ctg ctc atc tgg     2223
Val Met Gly Ala Ile Leu Leu Ile Gly Leu Ala Ala Leu Leu Ile Trp
700                 705                 710                 715
aaa ctc ctc atc acc atc cac gac cga aaa gaa ttc gct aaa ttt gag     2271
Lys Leu Leu Ile Thr Ile His Asp Arg Lys Glu Phe Ala Lys Phe Glu
                720                 725                 730
gaa gaa cgc gcc aga gca aaa tgg gac aca gcc aac aac cca ctg tat     2319
Glu Glu Arg Ala Arg Ala Lys Trp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr
            735                 740                 745
aaa gag gcc acg tct acc ttc acc aat atc acg tac cgg ggc act         2364
Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr
        750                 755                 760
taatgataag cagtcatcct cagatcatta tcagcctgtg ccaggattgc aggagtccct   2424
gccatcatgt ttacagagga cagtatttgt ggggagggat ttcggggctc agagtggggt   2484
aggttgggag aatgtcagta tgtggaagtg tgggtctgtg tgtgtgtatg tgggggtctg   2544
tgtgtttatg tgtgtgtgtt gtgtgtggga gtgtgtaatt taaaattgtg atgtgtcctg   2604
ataagctgag ctccttagcc tttgtcccag aatgcctcct gcagggattc ttcctgctta   2664
gcttgagggt gactatggag ctgagcaggt gttcttcatt acctcagtga gaagccagct   2724
ttcctcatca ggccattgtc cctgaagaga agggcagggc tgaggcctct cattccagag   2784
gaagggacac caagccttgg ctctaccctg agttcataaa tttatggttc tcaggcctga   2844
ctctcagcag ctatggtagg aactgctggc ttggcagccc gggtcatctg tacctctgcc   2904
tcctttcccc tccctcaggc cgaaggagga gtcagggaga gctgaactat tagagctgcc   2964
```

tgtgcctttt gccatcccct caacccagct atggttctct cgcaagggaa gtccttgcaa 3024
gctaattctt tgacctgttg ggagtgagga tgtctgggcc actcaggggt cattcatggc 3084
ctgggggatg taccagcatc tcccagttca taatcacaac ccttcaaaga tttgccttat 3144
tggcagctct actctggagg tttgtttaga agaagtgtgt cacccttagg ccagcaccat 3204
ctctttacct cctaattcca caccctcact gctgtagaca tttgctatga cctggggatg 3264
tctctcatga ccaaatgctt ttcctcaaag ggagagagtg ctattgtaga gccagaggtc 3324
tggccctatg cttccggcct cctgtccctc atccatagca cctccacata cctggccctg 3384
agccttggtg tgctgtatcc atccatgggg ctgattgtat ttaccttcta cctcttggct 3444
gccttgtgaa ggaattattc ccatgagttg gctgggaata agtgccagga tggaatgatg 3504
ggtcagttgt atcagcacgt gtggcctgtt cttctatggg ttacaacctc atttaactca 3564
gtctttaatc tgagaggcca cagtgcaatt ttattttatt tttctcatga tgaggttttc 3624
ttaacttaaa agaacatgta tataaacatg cttgcattat atttgtaaat ttatgtgtat 3684
ggcaaagaag gagagcatag gaaaccacac agacttgggc agggtacaga cactcccact 3744
tggcatcatt cacagcaagt cactggccag tggctggatc tgtgaggggc tctctcatga 3804
tagaaggcta tggggataga tgtgtggaca cattggacct ttcctgagga agagggactg 3864
ttcttttgtc ccagaaaagc agtggctcca ttggtgttga catacatcca acattaaaag 3924
ccacccccaa atgcccaaga aaaaaagaaa gacttatcaa catttgttcc atgagcagaa 3984
aactggagct ctggcctcag tgttacagct aaataatctt taattaaggc aagtcacttt 4044
cttcttctta aagctgtttc tagtttgaga aatgatggga ttttagcagc cagtcttgaa 4104
ggtctctttc agtatcaaca ttctaagatg ctgggactta ctgtgtcatc aaatgtgcgg 4164
ttaagattct ctgggatatt gatactgttt gtgtttttag ttgggagatc tgagagacct 4224
ggctttggca agagcagatg tcattccata tcacctttct caatgaaagt ctcattctat 4284
cctctctcca aacccgtttt ccaacatttg ttaatagtta cgtctctcct gatgtagcac 4344
ttaagcttca tttagttatt atttctttct tcactttgca cacatttgca tccacatatt 4404
agggaaggaa taagtagctg caaactatct attcctgtat tattgtgtta acattgagat 4464
aaacc 4469

<210> 6
<211> 762
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys
1 5 10 15
Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro
20 25 30
Leu Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn
35 40 45
Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu
50 55 60
Glu Asp Arg Pro Leu Ser Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val
65 70 75 80
Thr Gln Val Ser Pro Gln Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp
85 90 95
Ser Lys Asn Phe Ser Ile Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val
100 105 110
Asp Ile Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu
115 120 125
Trp Ser Ile Gln Asn Leu Gly Thr Lys Leu Ala Thr Gln Met Arg Lys
130 135 140
Leu Thr Ser Asn Leu Arg Ile Gly Phe Gly Ala Phe Val Asp Lys Pro
145 150 155 160
Val Ser Pro Tyr Met Tyr Ile Ser Pro Pro Glu Ala Leu Glu Asn Pro
165 170 175
Cys Tyr Asp Met Lys Thr Thr Cys Leu Pro Met Phe Gly Tyr Lys His
180 185 190
Val Leu Thr Leu Thr Asp Gln Val Thr Arg Phe Asn Glu Glu Val Lys
195 200 205
Lys Gln Ser Val Ser Arg Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp
210 215 220
Ala Ile Met Gln Ala Thr Val Cys Asp Glu Lys Ile Gly Trp Arg Asn
225 230 235 240
Asp Ala Ser His Leu Leu Val Phe Thr Thr Asp Ala Lys Thr His Ile
245 250 255
Ala Leu Asp Gly Arg Leu Ala Gly Ile Val Gln Pro Asn Asp Gly Gln
260 265 270
Cys His Val Gly Ser Asp Asn His Tyr Ser Ala Ser Thr Thr Met Asp

275 280 285
Tyr Pro Ser Leu Gly Leu Met Thr Glu Lys Leu Ser Gln Lys Asn Ile
290 295 300
Asn Leu Ile Phe Ala Val Thr Glu Asn Val Val Asn Leu Tyr Gln Asn
305 310 315 320
Tyr Ser Glu Leu Ile Pro Gly Thr Thr Val Gly Val Leu Ser Met Asp
325 330 335
Ser Ser Asn Val Leu Gln Leu Ile Val Asp Ala Tyr Gly Lys Ile Arg
340 345 350
Ser Lys Val Glu Leu Glu Val Arg Asp Leu Pro Glu Glu Leu Ser Leu
355 360 365
Ser Phe Asn Ala Thr Cys Leu Asn Asn Glu Val Ile Pro Gly Leu Lys
370 375 380
Ser Cys Met Gly Leu Lys Ile Gly Asp Thr Val Ser Phe Ser Ile Glu
385 390 395 400
Ala Lys Val Arg Gly Cys Pro Gln Glu Lys Glu Lys Ser Phe Thr Ile
405 410 415
Lys Pro Val Gly Phe Lys Asp Ser Leu Ile Val Gln Val Thr Phe Asp
420 425 430
Cys Asp Cys Ala Cys Gln Ala Gln Ala Glu Pro Asn Ser His Arg Cys
435 440 445
Asn Asn Gly Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Val Cys Arg Cys Gly Pro
450 455 460
Gly Trp Leu Gly Ser Gln Cys Glu Cys Ser Glu Glu Asp Tyr Arg Pro
465 470 475 480
Ser Gln Gln Asp Glu Cys Ser Pro Arg Glu Gly Gln Pro Val Cys Ser
485 490 495
Gln Arg Gly Glu Cys Leu Cys Gly Gln Cys Val Cys His Ser Ser Asp
500 505 510
Phe Gly Lys Ile Thr Gly Lys Tyr Cys Glu Cys Asp Asp Phe Ser Cys
515 520 525
Val Arg Tyr Lys Gly Glu Met Cys Ser Gly His Gly Gln Cys Ser Cys
530 535 540
Gly Asp Cys Leu Cys Asp Ser Asp Trp Thr Gly Tyr Tyr Cys Asn Cys
545 550 555 560
Thr Thr Arg Thr Asp Thr Cys Met Ser Ser Asn Gly Leu Leu Cys Ser
565 570 575
Gly Arg Gly Lys Cys Glu Cys Gly Ser Cys Val Cys Ile Gln Pro Gly
580 585 590
Ser Tyr Gly Asp Thr Cys Glu Lys Cys Pro Thr Cys Pro Asp Ala Cys
595 600 605
Thr Phe Lys Lys Glu Cys Val Glu Cys Lys Lys Phe Asp Arg Gly Ala
610 615 620
Leu His Asp Glu Asn Thr Cys Asn Arg Tyr Cys Arg Asp Glu Ile Glu
625 630 635 640
Ser Val Lys Glu Leu Lys Asp Thr Gly Lys Asp Ala Val Asn Cys Thr
645 650 655
Tyr Lys Asn Glu Asp Asp Cys Val Val Arg Phe Gln Tyr Tyr Glu Asp
660 665 670
Ser Ser Gly Lys Ser Ile Leu Tyr Val Val Glu Glu Pro Glu Cys Pro
675 680 685
Lys Gly Pro Asp Ile Leu Val Val Leu Leu Ser Val Met Gly Ala Ile
690 695 700
Leu Leu Ile Gly Leu Ala Ala Leu Leu Ile Trp Lys Leu Leu Ile Thr
705 710 715 720
Ile His Asp Arg Lys Glu Phe Ala Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala Arg
725 730 735
Ala Lys Trp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser
740 745 750
Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr
755 760

<210> 7
<211> 191
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7

cagagctgga gtgttaactg ggcccaactg tgtctaaata caatctttct ttccatccag 60
gtgagcttca gcattgaggc caaggtgcga ggctgttccc aggagaagga gaagtccttt 120
accataaagc ccgtgggctt caaggacagc ctgatcgtcc aggtcacctt tgattggact 180
gtgcctgcca g 191

<210> 8
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Trp Ala Gln Leu Cys Leu Asn Thr Ile Phe Leu Ser Ile Gln Val Ser
1 5 10 15
Phe Ser Ile Glu Ala Lys Val Arg Gly Cys Ser Gln Glu Lys Glu Lys
20 25 30
Ser Phe Thr Ile Lys Pro Val Gly Phe Lys Asp Ser Leu Ile Val Gln
35 40 45
Val Thr Phe Asp Cys Asp Cys Ala Cys Gln Ala Gln Ala Glu Pro Asn
50 55 60
Ser His Arg Cys Asn Asn
65 70

<210> 9
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 9
tccagagctg gagtgttaac tg 22

<210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 10
ctggcaggca cagtcacaat c 21

<210> 11
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 11
tccagagctg gagtgttaac tg 22

<210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 12
ctggcaggca cagtcacaat c 21

<210> 13
<211> 20

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 13
ccatccaggt gagcttcagc 20

<210> 14
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 14
agtggttgca ggtatatgag gg 22

<210> 15
<211> 14
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> sonda

<400> 15
gctgtcccca ggag 14

<210> 16
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> sonda

<400> 16
gaggctgtgc ccagga 16

<210> 17
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> sonda

<400> 17
gaggctgttc ccagg 15

<210> 18
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> sonda

<400> 18
tgaacctaat agccatcgc 19

REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de un gen GPIIIa, en el que el residuo de nucleótido correspondiente al de la posición 1297 de la SEQ ID NO: 1 es un residuo de timina, o un fragmento del mismo que comprende dicho residuo de timina y que tiene una longitud de al menos 10 bases.

2. Polinucleótido o el fragmento del mismo, según la reivindicación 1, seleccionado de los siguientes (i), (ii), (iii) y (iv):
(i) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1;
(ii) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 en la que se insertan, se sustituyen y/o se eliminan uno o más nucleótidos, y/o se añaden uno o más nucleótidos a uno o ambos de sus extremos, y que codifica una proteína funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
(iii) un polinucleótido que se hibrida, bajo condiciones rigurosas, con un polinucleótido que consiste en la secuencia complementaria de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, y que codifica una proteína funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y
(iv) un polinucleótido que tiene un 70% o más de identidad con un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, y que codifica una proteína funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2

3. Polinucleótido o el fragmento del mismo, según la reivindicación 1, que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una parte de la misma que tiene al menos 6 residuos de aminoácidos.

4. Polinucleótido o el fragmento del mismo, según la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma que tiene una longitud de al menos 10 bases.

5. Proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína GPIIIa, en la que el residuo de aminoácido que corresponde al de la posición 407 de la SEQ ID NO: 2 es un residuo de serina, o un fragmento de la misma que comprende dicho residuo de serina y que tiene al menos 6 residuos de aminoácidos.

6. Proteína o el fragmento de la misma, según la reivindicación 5, seleccionada de los siguientes (v), (vi), (vii) y (viii):
(v) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
(vi) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en la que se insertan, se sustituyen y/o se eliminan uno o más aminoácidos, y/o se añaden uno o más aminoácidos a uno o ambos de sus extremos, y que es funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
(vii) una proteína que es codificada por un polinucleótido que hibrida, en condiciones rigurosas, con un polinucleótido que consiste en la secuencia complementaria de una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y que es funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y
(viii) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene el 70% o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y que es funcionalmente equivalente a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

7. Proteína o el fragmento de la misma, según la reivindicación 5, que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una parte de la misma que tiene al menos 6 residuos de aminoácidos.

8. Kit para detectar el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa, que comprende un cebador que puede hibridar con una secuencia de nucleótidos del polinucleótido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una secuencia complementaria de la misma, y que se utiliza para la amplificación, mediante un procedimiento de amplificación de ácido nucleico, de una región que comprende el residuo de nucleótido en la posición 1297 que es un residuo de timina del gen GPIIIa o el residuo que se empareja con el mismo.

9. Kit, según la reivindicación 8, en el que el cebador consiste en un polinucleótido que comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos del polinucleótido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una secuencia complementaria de la misma.

10. Kit, según la reivindicación 8 o 9, en el que el cebador tiene una longitud de al menos 12 a 30 bases.

11. Kit para detectar el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa, que comprende un conjunto de cebadores que consiste en dos o más clases de los cebadores definidos en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, y que se utiliza para la amplificación, mediante un procedimiento de amplificación de ácido nucleico, de una región que comprende el residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa o el residuo que se empareja con el mismo.

12. Kit para detectar el polimorfismo 1297T del gen GPIIIa, que comprende una sonda que se puede hibridar con una secuencia de nucleótidos del polinucleótido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una secuencia complementaria de la misma, y que es para usar en la detección del residuo de timina en la posición 1297 del gen

GPIIIa.

13. Kit, según la reivindicación 12, en el que la sonda comprende un polinucleótido que se hibrida con una región que comprende el residuo de nucleótido en la posición 1297 del gen GPIIIa o el residuo que se empareja con el mismo en una secuencia de nucleótidos del polinucleótido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una secuencia complementaria de la misma.

14. Kit, según la reivindicación 12 o 13, en el que la sonda consiste en un polinucleótido que comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos del polinucleótido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una secuencia complementaria de la misma.

15. Kit, según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que la sonda tiene una longitud de al menos 12 a 30 bases.

16. Anticuerpo contra una proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, o un fragmento del mismo, que es específico para el residuo de aminoácido en la posición 407 de la proteína GPIIIa que es un residuo de serina.

17. Anticuerpo, según la reivindicación 16, para la determinación de púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune o del riesgo de desarrollar púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune, o la posibilidad de aparición de refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetas en la transfusión de plaquetas.

18. Kit para determinar la púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune o el riesgo de desarrollarla, o la posibilidad de aparición de la refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetas en la transfusión de plaquetas, que comprende al menos el anticuerpo, según la reivindicación 16.

19. Kit, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, para usar en la determinación de púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune o el riesgo de desarrollarla, o la posibilidad de aparición de la refractariedad a la terapia de transfusión de plaquetas en la transfusión de plaquetas.