

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 320**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2008** **E 13161747 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018** **EP 2613148**

54 Título: **Métodos y kits para la medida del factor de von Willebrand**

30 Prioridad:

23.08.2007 US 957604 P

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

13.06.2018

73 Titular/es:

BLOODCENTER OF WISCONSIN, INC. (100.0%)
638 N. 18th Street
Milwaukee, WI 53233, US

72 Inventor/es:

MONTGOMERY, ROBERT

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 672 320 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y kits para la medida del factor de von Willebrand

Declaración relativa a una investigación patrocinada federalmente

5 Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno de los Estados Unidos bajo los números de concesión RO1-HL033721-19 y RO1-HL081588-03, otorgado por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en esta invención.

Antecedentes

10 La invención se refiere de un modo general a métodos y kits para la medida del factor de von Willebrand (VWF), y más en particular a métodos y kits para medir el VWF que no requieren un agonista de la agregación plaquetaria, tal como la ristocetina.

15 El VWF es una glicoproteína multimérica sintetizada por megacariocitos y células endoteliales, que es posteriormente segregada en el plasma sanguíneo como un espectro de multímeros. El VWF se une a otras proteínas, especialmente proteínas implicadas en la hemostasia, como el factor VIII (un factor de coagulación esencial que participa en la ruta intrínseca de la coagulación sanguínea) y la glucoproteína plaquetaria Ib (GPIb, un componente de un complejo receptor de la adhesión plaquetaria). El VWF es deficiente o deficitario en la enfermedad de von Willebrand (VWD) y está involucrado en gran número de enfermedades, incluida la púrpura trombocitopénica trombótica, el síndrome de Heyde y posiblemente el síndrome urémico hemolítico. Véase, Sadler J., "Biochemistry and Genetics of von Willebrand factor". Annu. Rev. Biochem. 67: 395-424 (1998). Los niveles del VWF pueden estar afectados por muchos factores, incluido el grupo sanguíneo ABO y la etnia.

20 La VWD es un trastorno hemorrágico común caracterizado por defectos cualitativos o cuantitativos en las pruebas del VWF. Los síntomas de la VWD incluyen hematomas, menorragia y epistaxis. Actualmente se conocen muchos tipos de VWD hereditaria (por ejemplo, tipo 1, tipo 2A, 2B, 2M, 2N y tipo 3, así como pseudo VWD del tipo de las plaquetas, que resulta de un defecto en la GPIb plaquetaria); sin embargo, también se conocen formas adquiridas de VWD, pero se observan con menos frecuencia. De particular interés en este documento es la pseudo VWD de tipo plaquetario. Al contrario que con las otras formas de VWD, el defecto genético en pseudo VWD de tipo plaquetario es en las plaquetas en vez de VWF y se caracteriza por una afinidad de unión anormalmente alta de las plaquetas de un individuo al VWF, que lleva a una hiper-capacidad de respuesta plaquetaria característica *in vitro* a una baja concentración de ristocetina.

30 Los ensayos de cribado adicionales para VWD incluyen aquellos ensayos que miden la actividad del Factor VIII, el antígeno VWF (VWF: Ag), la unión de VWF al colágeno (VWF: CB) y la actividad del cofactor de ristocetina de VWF (VWF: RCo). De particular interés en el presente texto es VWF: RCo, que actualmente es el estándar para la medida de la función de VWF. El ensayo de VWF: RCo utiliza la capacidad de VWF para unir GPIb plaquetaria después de la activación por ristocetina, lo que da como resultado una aglutinación de plaquetas dependiente de VWF que puede medirse cuantitativamente mediante agregación plaquetaria o turbidometría. Véase, Macfarlane D, et al., "A method for assaying the von Willebrand factor (cofactor de ristocetina)", Thromb. Diath. Haemorrh. 34: 306-308 (1975). De hecho, se asignó a una actividad biológica en unidades internacionales un estándar internacional de referencia para VWF: RCo por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Comité Científico y de Normalización de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH).

40 Desgraciadamente, VWF: RCo tiene varios fallos. Por una parte, el ensayo de VWF: RCo tiene una alta imprecisión intra e inter ensayos debido a su dependencia de la ristocetina. Véase, por ejemplo, Chng W, et al., "Differential effect of the ABO blood group on von Willebrand factor collagen binding activity and ristocetin cofactor assay", Blood Coagul. Fibrinolysis 16: 75-78 (2005); Favalaro E, "An update on the von Willebrand factor collagen binding assay: 21 years of age and beyond adolescence but not yet a mature adult", Semin. Thromb. Hemost. 33: 727-744 (2007); y Riddel A, et al., "Use of the collagen binding assay for von Willebrand factor in the analysis of tipe 2M von Willebrand disease: a comparison with the ristocetin cofactor assay", Br. J. Haematol. 116: 187-192 (2002). Federici et al. han descrito recientemente un ensayo alternativo con reproducibilidad mejorada que utilizaba GPIb recombinante en un ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas de unión con VWF; sin embargo, es dependiente de la ristocetina. Véase, Federici A, et al., "A sensitive ristocetin co-factor activity assay with recombinant glycoprotein Ib for diagnosis of patients with low von Willebrand factor levels", Haematologica 89: 77-85 (2004).

50 Además, el VWF: RCo no siempre refleja la verdadera función de VWF *in vivo* cuando las mutaciones o polimorfismos están en la región de unión con ristocetina del VWF. Por ejemplo, algunos individuos tienen mutaciones de VWF que muestran una interacción reducida con la ristocetina de forma tal que VWF: RCo se reduce notablemente (p. ej., < 0,12 UI/dL), aunque no tienen síntomas hemorrágicos incluso con una cirugía invasiva. Véase, Flood V, et al., "Common VWF haplotypes in normal African-Americans and Caucasians recruited into the ZPMCB-VWD and their impact on VWF laboratory testing", Blood 10: Abstract 714 (2007); Mackie I, et al., "Ristocetin-induced platelet agglutination in Afro-Caribbean and Caucasian people", Br. J. Haematol. 50: 171-173 (1982); y Miller C, et al., "Measurement of von Willebrand factor activity: relative effects of ABO blood type and race",

J. Thromb. Haemost. 1: 2191-2197 (2003). Estos individuos, que parecen tener un polimorfismo en la región de unión a ristocetina, no tienen anomalías en la unión del VWF con la GPIb plaquetaria.

Además, el VWF: RCo se ve afectado por trastornos VWF/plaquetas de alta afinidad. Por ejemplo, individuos con pseudo VWD de tipo plaquetario tienen mutaciones GPIb que causan la unión espontánea de sus plaquetas al VWF. Véase, Franchini M, et al., "Clinical, laboratory and therapeutic aspects of platelet-type von Willebrand disease," Int. J. Lab. Hematol. 30: 91-94 (2008); Miller J y Castella A, "Platelet-type von Willebrand's disease: characterization of a new bleeding disorder," Blood 60: 790-794 (1982); y Miller J, "Platelet-type von Willebrand's Disease", Thromb. Haemost. 75: 865-869 (1996). Del mismo modo, las personas con VWD tipo 2B tienen mutaciones del VWF que causan la unión espontánea a las plaquetas. Véase, Weiss H, "Type 2B von Willebrand disease and related disorders of patients with increased ristocetin-induced platelet aggregation: what they tell us about the role of von Willebrand factor in hemostasis", J. Thromb. Haemost. 2: 2055-2056 (2004).

Debido a la amplia variabilidad y reproducibilidad del VWF: RCo, la técnica desea un ensayo de función de VWF que no requiera un agonista de la agregación de las plaquetas, tal como la ristocetina (es decir, sin ristocetina).

Tait et al. (2001) Blood, 98 (6): 1812-1818 se refiere a cambios de fenotipo que tienen como resultado la unión con alta afinidad del factor de von Willebrand con glucoproteína recombinante Ib-IX y análisis de las mutaciones de la enfermedad de von Willebrand de tipo plaquetario.

Resumen breve

La invención se refiere en general a métodos y *kits* para medir el VWF sin requerir un agonista de la aglutinación plaquetaria utilizando mutaciones de ganancia de función de la GPIb plaquetaria recombinante. Como se usa en este documento, un "agonista de la aglutinación plaquetaria" significa un agente que facilita la adhesión entre VWF y GPIb en pruebas de aglutinación plaquetaria. Los ejemplos de agonistas de la aglutinación plaquetaria incluyen, pero no se limitan a ellos, ristocetina y botrocetina.

En un primer aspecto, la presente invención se resume como un método para medir el factor de von Willebrand (VWF) sin usar un agonista de la aglutinación plaquetaria, comprendiendo el método las etapas de:

proporcionar una superficie que comprende glucoproteína Iba plaquetaria inmovilizada (GPIba) o un fragmento funcional de la misma, en donde la GPIba inmovilizada o fragmento funcional de la misma comprende al menos dos mutaciones seleccionadas entre el grupo consistente en G233V, D235Y y M239V relativas a SEQ ID NO: 2, en donde una de las mutaciones es D235Y;

poner en contacto con la superficie una muestra que tiene o se sospecha que tiene VWF, en donde la puesta en contacto se hace sin un agonista de la agregación plaquetaria; y

detectar un complejo de VWF y GPIba.

En algunas realizaciones del primer aspecto, la superficie puede ser una superficie celular tal que el método es una citometría de flujo (FC) o un ensayo de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS). Pueden ser células hospedadoras adecuadas un ovocito de *Xenopus*, una célula CHO-K1, una célula L929, una célula HEK-293T, una célula COS-7 o una célula S2 diseñada para comprender un polinucleótido que codifica GPIba plaquetaria que tiene al menos dos mutaciones seleccionadas entre el grupo consistente en G233V, D235Y y M239V con relación a la SEQ ID NO: 2 o un fragmento funcional de la misma. La célula hospedadora puede modificarse también por ingeniería genética para que comprenda además un polinucleótido que codifica la glicoproteína plaquetaria Ibβ (GPIbβ, SEQ ID NO: 4) y/o opcionalmente la glicoproteína plaquetaria IX (GP-IX, SEQ ID NO: 8) o fragmentos funcionales de la misma.

En algunas realizaciones del primer aspecto, la superficie puede ser una superficie de fase sólida tal que el método es un ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La superficie de la fase sólida puede ser de agarosa, vidrio, látex o material plástico.

En algunas realizaciones del primer aspecto, el complejo se puede detectar con un anticuerpo anti-VWF marcado o un fragmento funcional del mismo, tal como un anticuerpo marcado fluorescentemente o un fragmento funcional del mismo marcado fluorescentemente. Alternativamente, el complejo se puede detectar mediante resonancia de plasmón de superficie o dispersión de luz cuasi-elástica.

En algunas realizaciones del primer aspecto, la muestra puede ser una muestra biológica de un individuo que tiene o se sospecha que tiene VWD, tal como plasma.

En algunas realizaciones del primer aspecto, las al menos dos mutaciones pueden ser D235Y/G233V, D235Y/M239V o G233V/M239V. En otras realizaciones del primer aspecto, las al menos dos mutaciones pueden ser una mutación triple, tal como D235Y/G233V/M239V.

En un segundo aspecto, la presente invención se resume como un *kit* para medir el factor de von Willebrand (VWF) activo, comprendiendo el kit:

glucoproteína plaquetaria recombinante (GPIb α) o un fragmento funcional de la misma, en donde la GPIb α o el fragmento funcional de la misma comprende al menos dos mutaciones seleccionadas entre el grupo consistente en G233V, D235Y y M239V con relación a SEQ ID NO: 2, en donde una de las mutaciones es D235Y; y

un reactivo para detectar un complejo de VWF y GPIb α .

- 5 En algunas realizaciones del segundo aspecto, el reactivo puede ser un anticuerpo anti-VWF marcado o un fragmento funcional del mismo marcado, tal como un anticuerpo marcado fluorescentemente o un fragmento funcional marcado fluorescentemente del mismo.

En algunas realizaciones del segundo aspecto, el kit incluye además un control negativo o un control positivo, o ambos. Si se incluye el control negativo, este puede ser plasma empobrecido en VWF. Si se incluye el control positivo, puede ser plasma agrupado de individuos que no tienen VWD o puede ser un patrón disponible comercialmente, como los disponibles en la OMS y la ISTH. En otras realizaciones del segundo aspecto, el kit incluye además un control anormal. Si se incluye, el control anormal puede ser plasma agrupado de individuos con formas variantes de VWD, como el tipo 2A, 2B o 2M VWD, así como el plasma agrupado de individuos con verdadera pérdida de la función VWF *in vivo* o individuos de plasma agrupado que no son ensayados apropiadamente usando VWF: RCo (es decir, plasma de individuos que tienen cualquier mutación de ganancia de función en VWF).

En algunas realizaciones del segundo aspecto, las al menos dos mutaciones se pueden seleccionar entre D235Y/G233V, D235Y/M239V o G233V/M239V. En otras realizaciones del segundo aspecto, las al menos dos mutaciones pueden ser una mutación triple, tal como D235Y/G233V/M239V.

- 20 En algunas realizaciones del segundo aspecto, la GPIb α plaquetaria recombinante que tiene al menos dos mutaciones seleccionadas entre G233V, D235Y y M239V con relación a la SEC ID N°: 2 o un fragmento funcional de la misma puede inmovilizarse en una superficie. En ciertas realizaciones, la superficie puede ser una superficie de la célula hospedadora de una célula hospedadora que no expresa nativamente GPIb α plaquetaria, como se describió anteriormente. En otras ciertas realizaciones, la superficie puede ser una superficie de fase sólida, como se describió anteriormente.

Estas y otras características, objetos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor a partir de la descripción que sigue. En la descripción, se hace referencia a los dibujos adjuntos, que forman parte del presente documento y en los que se muestra a modo de ilustración, no de forma limitante, las realizaciones de la invención. Se entiende que la descripción de las realizaciones preferidas no limita la invención para cubrir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se entenderá mejor y las características, aspectos y ventajas distintas de las expuestas anteriormente se harán evidentes cuando se considere la siguiente descripción detallada de la misma. Tal descripción detallada hace referencia a los siguientes dibujos, en los que:

- 35 La FIG. 1 es una ilustración esquemática del receptor de adhesión de plaquetas, que muestra los componentes del receptor, que incluyen GPIb α , GPIb β , GP-V y GP-IX;

Las FIGS. 2A a C muestran el efecto de las mutaciones de GPIb α (simple, doble o triple, FIG. 2A, el eje y es la fluorescencia media y el eje x es la concentración logarítmica de ristocetina en mg/mL), ristocetina (FIG. 2B, el eje y es fluorescencia media y el eje x es la concentración logarítmica de ristocetina en mg/ml) y botrocetina (figura 2C, el eje y es fluorescencia media y el eje x es la concentración logarítmica de botrocetina en mg/ml) durante FACS. "Mock" o "control" es células HEK-293T transfectadas con un vector de expresión vacío.

La FIG. 3 muestra un ensayo FACS con GPIb α que tiene dos mutaciones de pseudo VWD de tipo plaquetas usando muestras de individuos testigo y con VWD de tipo 3, que tiene un VWF entre bajo e indetectable (el eje y es fluorescencia media y el eje x es diluciones de plasma pobre en plaquetas (PPP)).

- 45 La FIG. 4 muestra un ensayo FACS con muestras adicionales de individuos que tienen VWD tipo 2B, que tiene mutaciones de VWF de ganancia de función (el eje y es fluorescencia media y el eje x es diluciones de plasma pobre en plaquetas (PPP)).

La FIG. 5 muestra un ensayo FACS con muestras adicionales de individuos que tienen VWD tipo 2M, que tiene una baja unión a GPIb, y VWD tipo 2M aparente, que tiene bajo VWF: RCo / VWF: Ag, niveles normales de VWF (el eje y es fluorescencia media y el eje x es diluciones de plasma pobre en plaquetas (PPP)).

La FIG. 6 muestra el efecto de la carga sobre la superficie de fase sólida durante un ELISA con GPIb α inmovilizada que tiene dos mutaciones de pseudo VWD de tipo plaquetario (el eje y es fluorescencia media y el eje x es la concentración de ISTH (un patrón) en U/dL).

Aunque la presente invención es susceptible de diversas modificaciones y formas alternativas, los ejemplos de realizaciones de la misma se muestran a modo de ejemplo en los dibujos y se describen con detalle en este documento. Sin embargo, debe entenderse que la descripción de las realizaciones preferidas no pretende limitar la invención a las formas particulares descritas, sino que, por el contrario, la intención es cubrir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que caen dentro del espíritu y alcance de la invención según se define en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

La presente invención procede de la observación del inventor de que algunos individuos con EWW tienen mutaciones de VWF que reducen el VWF: RCo (es decir, < 10 UI/dL), aunque su función VWF *in vivo* es normal (es decir, VWF aún se une al componente receptor de adhesión de plaquetas GPIIb). Véase, Friedman K, et al., "Factitious diagnosis of type 2M von Willebrand disease (VWD) with a mutation in von Willebrand factor (VWF) that affects the ristocetin cofactor assay but does not significantly affect VWF function *in vitro*": Blood 98: 536a (2001).

En cambio, otros individuos con VWD (es decir, VWD tipo 2B y de tipo plaquetario) tienen mutaciones de VWF o GPIIb que reducen la concentración de ristocetina requerida para la agregación de las plaquetas en un ensayo para la función de VWF. Esta paradoja resulta de las mutaciones de ganancia de función que hacen que los multímeros de VWF y los receptores de GPIIb en las plaquetas se unan más estrechamente entre ellos. El inventor planteó la hipótesis de que las mutaciones de GPIIb de ganancia de función recombinante podrían ser útiles en ensayos para la función de VWF, evitando así la ristocetina (es decir, sin ristocetina). Como se usa en el presente documento, "sin ristocetina" o "sin agonista" significa que en un ensayo de VWF no se requiere ristocetina ni otros agonistas de aglutinación de plaquetas (es decir, botrocetina).

Por consiguiente, la presente invención se refiere de forma amplia a nuevos métodos y *kits* para VWF que utilizan mutaciones GPIIb de ganancia de función, especialmente mutaciones GPIIb identificadas en individuos que tienen pseudo VWD de tipo plaqueta, para medir VWF (denominado aquí "VWF: IbCo"). Los métodos y *kits* son útiles en una diversidad de aplicaciones. Por ejemplo, los métodos y *kits* descritos en este documento se pueden usar para diagnosticar VWD en un individuo sospechoso de tener VWD, clasificar VWD en un individuo diagnosticado con VWD y monitorizar el tratamiento en un individuo que tiene VWD.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente texto tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque en la práctica o prueba de la presente invención puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento, se describen en este documento los métodos y materiales preferidos.

Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" significa dentro del 5% de un margen de concentración, margen de pureza, intervalo de temperatura o marco de tiempo establecido.

Como se usa en el presente texto, una "secuencia codificadora" significa una secuencia que codifica un polipéptido particular, tal como GPIIb, y es una secuencia de ácidos nucleicos que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso de ARNm) en ese polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificadora se determinan mediante un codón de iniciación en un extremo 5' (amino) y un codón de parada de la traducción en un extremo 3' (carboxi). Una secuencia codificadora puede incluir, pero no se limita a ellas, secuencias de ácido nucleico virales, ADNc de ARNm procarionta o eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN procarionta o eucariota, e incluso secuencias de ADN sintéticas. Una secuencia de terminación de la transcripción se ubicará usualmente en 3' con relación a la secuencia codificadora.

Como se usa en el presente documento, una "secuencia de expresión" significa una secuencia de control unida operativamente a una secuencia codificadora.

Como se usa en el presente texto, "secuencias de control" significa secuencias promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores aguas arriba, orígenes de replicación, sitios internos de entrada al ribosoma ("IRES"), potenciadores y similares, que proporcionan colectivamente la replicación, la transcripción y la traducción de una secuencia codificadora en una célula receptora. No todas estas secuencias de control necesitan estar siempre presentes, siempre y cuando la secuencia de codificación seleccionada sea capaz de replicarse, transcribirse y traducirse en una célula hospedadora apropiada.

Como se usa en el presente documento, un "promotor" significa una región de nucleótidos que comprende una secuencia reguladora de ácido nucleico (es decir, ADN, en donde la secuencia reguladora se deriva de un gen que es capaz de unirse a la ARN polimerasa y de iniciar la transcripción de una secuencia codificadora aguas abajo (dirección 3')). Los promotores de la transcripción pueden incluir "promotores inducibles" (donde la expresión de una secuencia de polinucleótidos ligada operativamente al promotor es inducida por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), "promotores reprimibles" (donde la expresión de una secuencia de polinucleótidos ligada operativamente al promotor es reprimida por un analito, un cofactor, una proteína reguladora, etc.) y "promotores constitutivos" (donde la expresión de una secuencia de polinucleótidos ligada operativamente al promotor no está regulada y por lo tanto es continua).

Como se usa en el presente texto, una secuencia de "ácido nucleico" significa una secuencia de ADN o ARN. El término abarca secuencias que incluyen, pero sin limitarse a ellas, cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN tales como 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5- fluorouracilo, 5- bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, éster metílico del ácido uracilo-5-oxiacético, ácido uracilo-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil 5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

Como se usa en el presente documento, "unido operativamente" significa que los elementos de una secuencia de expresión están configurados para realizar su función habitual. Por tanto, las secuencias de control (es decir, promotores) unidas operativamente a una secuencia codificadora son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificadora. Las secuencias de control no necesitan ser contiguas a la secuencia de codificación, siempre y cuando funcionen para dirigir su expresión. Por ejemplo, las secuencias interpuestas no traducidas, pero transcritas, pueden estar presentes entre un promotor y una secuencia codificadora, y la secuencia promotora todavía se puede considerar "unida operativamente" a la secuencia codificadora.

Como se usa en este documento, "interacción operable" significa que las subunidades de un polipéptido (por ejemplo, los componentes del receptor de adhesión de las plaquetas, tales como GPIIb β y/o GP-IX) y cualquier otra proteína accesoria, que se expresa heterológicamente en una célula hospedadora, se ensambla en un receptor de adhesión plaquetaria funcional (es decir, capaz de unión con VWF o fragmentos funcionales de la misma capaces de unirse a VWF).

Como se usa en el presente documento, un "vector" significa un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que puede unirse otro segmento de ácido nucleico para provocar la replicación del segmento unido. Un vector es capaz de transferir secuencias génicas a células diana (por ejemplo, vectores plasmídicos bacterianos, portadores en partículas y liposomas).

Típicamente, los términos o expresiones "constructo vectorial", "vector de expresión", "vector de expresión génica", "vector de suministro de genes", "vector de transferencia génica" y "casete de expresión" se refieren todos ellos a un ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de una secuencia codificadora o gen de interés. Así pues, los términos incluyen vehículos de clonación y expresión.

Como se usa en el presente documento, un "polinucleótido aislado" o "polipéptido aislado" significa un polinucleótido o polipéptido aislado de su entorno natural o preparado usando métodos de síntesis tales como los conocidos por los expertos en la técnica. En ninguno de los casos se requiere una purificación completa. Los polinucleótidos y polipéptidos descritos en este documento se pueden aislar y purificar a partir del material normalmente asociado de formas convencionales, de forma tal que, en la preparación purificada, el polinucleótido o polipéptido es la especie predominante en la preparación. Como mínimo, el grado de purificación es tal que el material extraño en la preparación no interfiere con el uso del polinucleótido o polipéptido de la manera descrita aquí. El polinucleótido o polipéptido es de al menos aproximadamente 85% de pureza; alternativamente, al menos aproximadamente 95% de pureza; y alternativamente, al menos aproximadamente 99% de pureza.

Además, un polinucleótido aislado tiene una estructura que no es idéntica a la de cualquier molécula de ácido nucleico de origen natural o a la de cualquier fragmento de un ácido nucleico genómico de origen natural que abarca más de un gen. Un polinucleótido aislado también incluye, sin que sea limitación, (a) un ácido nucleico que tiene una secuencia de una molécula de ácido nucleico genómica o extracromosómica de origen natural, pero que no está flanqueada por las secuencias codificadoras que flanquean la secuencia en su posición natural; (b) un ácido nucleico incorporado en un vector o en un genoma de una célula hospedadora procarionota o eucariota de modo que el polinucleótido resultante no es idéntico a cualquier vector de origen natural o ADN genómico; (c) una molécula distinta tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que es parte de un gen híbrido (es decir, un gen que codifica una proteína de fusión). Se excluyen específicamente de esta definición los ácidos nucleicos presentes en mezclas de clones, por ejemplo, ya que estos se producen en una biblioteca de ADN tal como una biblioteca de ADN genómico o ADNc. Un polinucleótido aislado puede ser ADN o ARN modificado o no modificado, bien sea total o parcialmente monocatenario o bicatenario o incluso tricatenario. Además, un polinucleótido aislado puede modificarse química o enzimáticamente y puede incluir las llamadas bases no estándar tales como inosina.

Como se usa en el presente texto, "homólogo" significa los polinucleótidos o polipéptidos que comparten al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia, por ejemplo con SEC ID N°: 1 a 6, respectivamente, que dan como resultado polipéptidos funcionales que se unen a VWF. Por ejemplo, un polipéptido que es al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95% idéntico a las mutaciones de GPIIb α discutido en el presente texto, es de esperar que sea un constituyente del receptor de adhesión de las

5 plaquetas. Un experto en la técnica entiende que las modificaciones al polinucleótido o bien al polipéptido incluyen sustituciones, inserciones (p. ej., añadiendo no más de aproximadamente diez nucleótidos o aminoácidos) y deleciones (p. ej., eliminación de no más de aproximadamente diez nucleótidos o aminoácidos). Estas modificaciones se pueden introducir en el polinucleótido o polipéptido descrito a continuación sin abolir la estructura y, finalmente, la función. Los polinucleótidos y/o polipéptidos que contienen tales modificaciones pueden usarse en los métodos de la presente invención. Dichos polipéptidos pueden identificarse usando los métodos de selección descritos a continuación.

10 Un ácido nucleico aislado que contiene un polinucleótido (o su complemento) que puede hibridarse con cualquiera de las secuencias de ácido nucleico ininterrumpidas descritas anteriormente, bajo unas condiciones de hibridación rigurosas o moderadamente rigurosas, también está dentro del alcance de la presente invención. Las condiciones de hibridación rigurosas se definen como hibridación a 68°C en 5 x SSC/5 x solución de Denhardt /1,0% SDS, y lavado en 0,2 x SSC/0,1% SDS ± 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a temperatura ambiente, y las condiciones de hibridación moderadamente rigurosas se definen como el lavado en el mismo tampón a 42°C. En la técnica se dispone fácilmente de unas directrices adicionales relativas a tales condiciones, p. ej., en Sambrook J, et al. (eds.), "Molecular cloning: a laboratory manual", (3ª ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 2001); y Ausubel F, et al. (eds.), "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley & Sons, N. Y.)

15 Es bien conocido en la técnica que los aminoácidos dentro del mismo grupo conservador pueden sustituirse típicamente entre sí sin afectar sustancialmente a la función de una proteína. Para el propósito de la presente invención, dichos grupos conservadores se exponen en la Tabla 1 y se basan en propiedades compartidas.

20 Tabla 1. Sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Resto original	Sustitución conservadora
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

25 Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" significa un anticuerpo monoclonal y policlonal y puede pertenecer a cualquier clase de anticuerpo (es decir, IgG, IgM, IgA, etc.). Un profesional con una experiencia normal en la técnica está familiarizado con los métodos para preparar anticuerpos monoclonales (Mab). Por ejemplo, un experto en la técnica puede fabricar anticuerpos monoclonales aislando linfocitos y fusionándolos con células de mieloma, produciendo así hibridomas. Véase, p. ej., Milstein C, "Handbook of experimental immunology" (Blackwell Scientific Pub., 1986); y Goding J, "Monoclonal antibodies: principles and practice" (Academic Press). Los

hibridomas clonados se exploran después para producir, por ejemplo, "anti-GPIIb α " (es decir, anticuerpos que se unen preferentemente a GPIIb α o fragmentos de los mismos) o anticuerpos "anti-VWF" (es decir, anticuerpos que se unen preferentemente a VWF o fragmentos de los mismos). Así pues, los anticuerpos monoclonales no están limitados por la forma en que se producen los anticuerpos, tanto si dicha producción es *in situ* como si no. Alternativamente, los anticuerpos pueden producirse mediante tecnología de ADN recombinante que incluye, pero no se limita a ellas, la expresión en bacterias, levaduras, líneas de células de insectos o líneas de células de mamíferos.

Del mismo modo, un experto en la técnica está familiarizado con los métodos para preparar anticuerpos policlonales. Por ejemplo, un experto en la técnica puede preparar anticuerpos policlonales inmunizando un animal hospedador adecuado, p. ej. un conejo, con un inmunógeno y usando suero apropiadamente diluido o aislando inmunoglobulinas del suero. Por tanto, el animal puede inocularse con el inmunógeno, retirándose posteriormente la sangre del animal y se purifica una fracción de IgG. Otros animales hospedadores adecuados incluyen un pollo, cabra, oveja, cobaya, rata o ratón. Si se desea, el inmunógeno se puede administrar como un conjugado en el que el inmunógeno se acopla, por ejemplo, a través de una cadena lateral de uno de sus restos de aminoácido, a un vehículo adecuado. La molécula transportadora es típicamente un vehículo fisiológicamente aceptable. El anticuerpo obtenido puede purificarse hasta una pureza que llegue hasta aproximadamente un 70%, hasta aproximadamente 80%, hasta aproximadamente 90%, hasta aproximadamente 95%, hasta aproximadamente 99% o hasta aproximadamente 100%.

El anticuerpo también abarca fragmentos funcionales, como Fab y F(ab')₂, de anticuerpos anti-GPIIb α o anti-VWF. El tratamiento de anticuerpos con enzimas proteolíticas, tales como papaína y pepsina, genera estos fragmentos de anticuerpo, especialmente fragmentos anti-GPIIb α .

Los anticuerpos se conjugan típicamente con un marcador detectable para una fácil visualización. Los ejemplos de marcadores adecuados para los métodos y kits descritos en el presente texto incluyen, pero no se limitan a ellos, marcadores radiactivos, biotina (que puede detectarse mediante avidina o estreptavidina conjugada con peroxidasa), lantánidos, fosfatasa alcalina y marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, especialmente la familia Alexa Fluor[®] de colorantes fluorescentes disponibles de Invitrogen/Molecular Probes). El marcado del anticuerpo se puede llevar a cabo p. ej. marcando grupos amina libres (covalente o no covalentemente). Algunos marcadores pueden detectarse utilizando un contador marcado adecuado para la detección de la etiqueta en cuestión.

Los anticuerpos anti-GPIIb α comercialmente disponibles y los anticuerpos anti-VWF son adecuados para usar con los métodos y *kits* descritos en este documento, y se pueden obtener de Blood Research Institute (Milwaukee, WI) y Dako (Carpinteria, CA), respectivamente.

Como se muestra en la FIG. 1, el receptor de adhesión de las plaquetas se compone de una combinación de cuatro proteínas, que incluye GPIIb, que es un heterodímero de una cadena alfa (GPIIb α ; número de ingreso de GenBank NM_000173.4; SEC ID N^o: 1-2) y una cadena beta (GPIIb β ; número de ingreso de GenBank NM_000407.4, SEC ID N^o: 3-4) ligada mediante enlaces disulfuro. Otros componentes del receptor incluyen GP-V (número de ingreso de GenBank NM_004488.2, SEC ID N^o: 5-6) y GP-IX (número de ingreso de GenBank NM_000174.2, SEC ID N^o: 7-8). El receptor de adhesión de las plaquetas se une a VWF (número de ingreso de GenBank NM_000552.3, SEC ID N^o: 9-10) para regular la hemostasia y la trombosis.

De particular interés en el presente texto es la GPIIb α humana modificada de modo que no se requiere un agonista de la agregación de plaquetas en los ensayos de la función de VWF. Por ejemplo, la GPIIb α puede modificarse para que incluya las mutaciones de ganancia de función que causan pseudo VWD de tipo plaquetas, que incluye, pero no se limita a ella, G233V (véase, Miller J, et al., "Mutation in the gene coding the alpha chain of platelet glycoprotein Ib in platelet-type von Willebrand disease", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4761-4765 (1991), D235V (véase, Dong J, et al., "Novel gain-of-function mutations of platelet glycoprotein IB α by valine mutagenesis in the Cys209-Cys248 disulfide loop, which interacts with the A1 domain of VWF. Functional analysis under static and dynamic conditions", J. Biol. Chem. 275: 27663-27670, M239V (véase, Russell S & Roth G, "Pseudo von Willebrand disease: a mutation in the platelet glycoprotein Ib alpha gene associated with a hyperactive Surface receptor", Blood 81: 1787-1791 (1993), G233S (Matsubara Y, et al., "Identification of a novel point mutation in platelet glycoprotein Ib, Gly to Ser at residue 233, in a Japanese family with platelet-type von Willebrand disease", J. Thromb. Haemost. 1: 2198-2205 (2003)); y K237V (véase, Dong et al., supra). Ventajosamente, la mutación o las mutaciones pueden estar en el puente disulfuro Cys²⁰⁹-Cys²⁴⁸ de GPIIb α que compromete la hemostasia aumentando la afinidad de GPIIb α por VWF. Por ejemplo, y como se muestra más adelante, el inventor encontró que D235Y es otra mutación de ganancia de función adecuada para su uso con los métodos y *kits* descritos en el presente texto.

Como se usa en este documento, un "fragmento funcional" significa un fragmento de un componente de un receptor de adhesión de plaquetas, tal como un fragmento de GPIIb α , que tiene al menos dos de la mutación antes mencionada, pero que retiene su capacidad para interactuar con VWF u otros sustratos. Por ejemplo, el término amino de GPIIb α conserva su capacidad de interactuar con VWF. Como se muestra más adelante, los fragmentos de GPIIb α tan pequeños como 290 aminoácidos y que tienen dos mutaciones retuvieron la capacidad de interactuar con el VWF, aunque se contemplan fragmentos más pequeños. Respecto a VWF, un fragmento funcional puede

comprender al menos el dominio A1, que es el dominio de unión de GPIb. Con respecto a los anticuerpos, los fragmentos funcionales son aquellas porciones de un anticuerpo que se unen a un epítipo particular, tal como los dominios indicados anteriormente.

5 Como se usa en el presente texto, una "muestra" significa una muestra biológica, tal como líquido amniótico, humor acuoso, fluido cerebroespinal, fluido intersticial, linfa, plasma, líquido pleural, saliva, suero, esputo, líquido sinovial, sudor, lágrimas, orina, leche materna o tejido que tiene o se sospecha que tiene VWF. Con respecto a la medida de VWF, el plasma es una muestra adecuada.

10 Como se usa en el presente texto, una "superficie" significa, por ejemplo, la superficie de una célula o la superficie de una fase sólida, tal como un material polimérico insoluble, que puede ser un polímero orgánico como la poliamida o un polímero de vinilo (por ejemplo, poli(met)acrilato, poliestireno y polialcohol vinílico o derivados del mismo), un polímero natural, tal como celulosa, dextrano, agarosa, quitina y poliaminoácidos, o un polímero inorgánico, tal como vidrio o plástico. La superficie de fase sólida puede estar en forma de una esfera, microvehículo, partícula, membrana, tira, papel, película, perla o placa, en particular una placa de microtítulo.

15 Un aspecto de la presente invención incluye un ensayo de diagnóstico para medir el VWF. La metodología de base del ensayo puede ser FC, FACS o ELISA, cada uno de los cuales es bien conocido por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Alice Giva, "Flow cytometry: first principles" (2ª ed. Wiley-Liss, Nueva York, 2001); Howard Shapiro, "Practical flow cytometry", (4ª ed., Wiley-Liss, Nueva York, 2003); Larry Sklar, "Flow cytometry for biotechnology" (Oxford University Press, Nueva York, 2005); J. Paul Robinson, et al., "Handbook of flow cytometry" (Wiley-Liss, Nueva York, 1993); "Flow cytometry in clinical diagnosis" (3ª ed., Carey, McCoy y Keren, eds., ASCP Press 2001); Lequin R, "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)", Clin. Chem. 51: 2415-2418 (2005); Wide L & Porath J, "Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex-coupled antibodies", Biochem. Biophys. Acta. 30: 257-260 (1966); Engvall E & Perlman P, "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G", Immunochemistry 8: 871-874 (1971); y Van Weemen B & Schuurs A, "Immunoassay using antigen-enzyme conjugates", FEBS Letters 15: 232-236 (1971),

25 Como se señaló anteriormente, la superficie para los métodos y kits descritos en la presente memoria puede ser la superficie de una célula hospedadora que exprese al menos GPIb α de plaquetas para uso en FACS. Por ejemplo, se puede expresar de manera heteróloga (bien sea de forma transitoria o estable) GPIb α mutante u otros componentes del receptor de adhesión de las plaquetas (es decir, GPIb β y/o GP-IX) en las células hospedadoras. Los expertos en la técnica conocen los métodos para expresar polinucleótidos y sus polipéptidos receptores de glucoproteínas plaquetarias codificados en células hospedadoras heterólogas. Véase, por ejemplo, Tait A, et al., "Phenotype changes resulting in high-affinity binding of von Willebrand factor to recombinant glycoprotein Ib-IX: analysis of the platelet-type von Willebrand disease mutations", Blood 98: 1812-1818 (2001), y Dong et al., supra.

30 Las células adecuadas para su uso en la presente invención no muestran de forma nativa GPIb α o los otros componentes del complejo receptor de adhesión de plaquetas. Uno de estos tipos de células son las células HEK-293T (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, número de catálogo CRL-11268). Véase también Graham F, y col., "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5", J. Gen. Virol. 36: 59-74 (1977). Las células HEK-293 son fáciles de reproducir y mantener, son susceptibles de transfección usando una amplia variedad de métodos, tienen una alta eficacia de transfección y producción de proteínas, tienen traducción fidedigna y procesamiento de proteínas, y tienen un tamaño de célula pequeño con procesos mínimos apropiados para experimentos electrofisiológicos.

35 Otro tipo de célula adecuado son las células COS-7 (ATCC; n.º de catálogo CRL-1651). Véase también, Gluzman Y, "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants", Cell 23: 175-182 (1981). Al igual que las células HEK-293, las células COS-7 son fáciles de reproducir y mantener, y son susceptibles de transfección usando una amplia variedad de métodos.

45 Otro tipo de célula adecuada son los ovocitos de *Xenopus*. Los ovocitos de *Xenopus* se usan comúnmente para la expresión de genes heterólogos debido a su gran tamaño (~1,0 mm), que hacen fácil su manejo y su manipulación. Los ovocitos de *Xenopus* se prestan fácilmente a inyección y por tanto expresan proteínas funcionales cuando se inyectan con ARNc para una proteína deseada.

50 Otro tipo más de célula adecuado son las células de *Drosophila melanogaster* S2. Las células S2 son ideales para proteínas difíciles de expresar, y se dispone comercialmente de un sistema de expresión S2 en Invitrogen (Carlsbad, CA). El sistema de expresión S2 se puede diseñar para que preferiblemente carezca de la secuencia de secreción de Bip de manera que las proteínas codificadas se expresen en la superficie celular. La expresión de los componentes del receptor de adhesión plaquetaria en las células S2 fue mostrada previamente por Celikel et al. Véase, Celikel R, et al., "Modulation of alpha-thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Iba", Science 301: 218-221 (2003).

55 Cualquiera de los polinucleótidos contemplados para el receptor de adhesión de plaquetas puede clonarse en un vector de expresión (o una diversidad de vectores de expresión) construidos para soportar la expresión a partir de los polinucleótidos. Los vectores de expresión adecuados comprenden un promotor transcripcional activo en una

célula huésped receptora aguas arriba, por ejemplo, de un polinucleótido GPIIb modificado por ingeniería genética para que tenga las mutaciones mencionadas anteriormente o polinucleótidos adicionales, y puede comprender opcionalmente una secuencia de adición de poliA aguas abajo del polinucleótido.

5 El vector o vectores pueden ser introducidos (o co-introducidos), por ejemplo, mediante transfección o lipofección, en células hospedadoras receptoras competentes para recibir y expresar GPIIb mutante y opcionalmente otros componentes del receptor de adhesión de plaquetas. Se puede emplear un *kit* de lipofección disponible comercialmente, tal como un *kit* disponible de Mirus Corporation (Madison, WI). Preferiblemente, las células hospedadoras receptoras no contienen GPIIb de forma nativa, por lo que la presencia de la misma es completamente atribuible a la expresión del vector de expresión introducido. Las células huésped receptoras
10 adecuadas se describen anteriormente y pueden expresar los polipéptidos en su superficie o segregarlos.

Alternativamente, la superficie para los métodos y kits descritos en el presente texto puede ser una superficie de fase sólida que tiene GPIIb plaquetario inmovilizado sobre la misma, por ejemplo mediante unión covalente o anticuerpos. Las superficies de fase sólida adecuadas incluyen las superficies de fase sólida descritas anteriormente. Un experto en la materia está familiarizado con métodos para unir anticuerpos anti-GPIIb o fragmentos funcionales de los mismos a superficies de fase sólida. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento funcional del mismo se puede inmovilizar en la superficie directamente mediante acoplamiento covalente o a través de un vehículo tal como una molécula de enlace o un anticuerpo inmovilizado en la superficie de la fase sólida. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal, tal como anti-GPIIb o un fragmento funcional del mismo. Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-epítipo que reconoce una etiqueta de epítipo (por ejemplo, biotina, digoxigenina, GST, hexahistidina, hemaglutinina, FLAG™, c-Myc, VSV-G, V5 y HSV) complejoado con GPIIb. Las etiquetas de epítipo disponibles comercialmente y sus respectivos anticuerpos son adecuadas para su uso con los métodos y kits descritos en este documento, y se pueden obtener de Sigma Aldrich (St. Louis, MO) y Abcam, Inc. (Cambridge, MA).
15
20

Los métodos y kits descritos en el presente texto son pues sensibles a la medida de los multímeros de VWF más grandes y funcionales, se correlacionan con VWF: Ag en individuos con función de VWF reducida y permanecen no afectados por mutaciones que afectan a la unión a VWF de la ristocetina pero no tienen un fenotipo hemorrágico.
25

La invención se entenderá mejor al considerar los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

30 Ejemplo 1: Células que expresan heterogéneamente la unión espontánea de GPIIb mutante en ausencia de ristocetina.

Métodos: Se construyó un sistema de expresión del receptor de adhesión de plaquetas heterólogo mediante la transfección transitoria de células HEK-293T (ATCC) con un constructo GPIIb de longitud completa que codifica una mutación simple (es decir, G233V, D235Y o M239V), una mutación doble (es decir, G233V/M239V, G233V/D235Y o D235Y/M239V) o una mutación triple (es decir, G233V/D235Y/M239V) relativa a la SEC ID N°: 2 o GPIIb de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2). Algunas células HEK-293T también se transfectaron transitoriamente con constructos GPIIb β y GP-IX que codifican las SEQ ID NOS: 4 y 8, respectivamente. Un grupo simulado (*mock*) de células HEK-293T fue tratado de manera similar, pero se transfectaron con un vector de expresión que carecía de los constructos anteriores, sirviendo así como controles o testigos.
35

Los constructos se clonaron en un vector pCI-neo (Promega, Madison, WI) y se expresaron en células HEK-293T como se describe más adelante. En algunos casos, se realizaron construcciones separadas para cada mutación GPIIb; sin embargo, en otros casos se hizo una única construcción que tenía múltiples mutaciones de GPIIb.
40

Brevemente, las células HEK-293T se sembraron en primer lugar hasta que llegaron a una confluencia del 50-80% (es decir, 3,5-4 x 10⁶/100 mm de placa). Normalmente, las células se sembraron el día anterior a la transfección.

45 Para la transfección se calentaron a 37°C Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) y OptiMEM (Invitrogen). Se añadieron 800 μ l de OptiMEM a 17 x 100 tubos de poliestireno (2 tubos/placa a transfectar). Se añadió lo siguiente a un conjunto de tubos: 4,5 μ g de ADN (1,5 μ g de cada constructo) y 20 μ l de reactivo PLUS (Invitrogen). A otro conjunto de tubos se añadió lo siguiente: 30 μ l de Lipofectamina (Invitrogen). Cada conjunto se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla de ADN se añadió después a la mezcla de Lipofectamina y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Durante la incubación, las células se lavaron dos veces con 5 ml de HBSS. Se añadieron 3,4 ml de OptiMEM a la mezcla de ADN/Lipofectamina, y después se añadieron a las células HEK-293T (volumen total = 5 ml). Las células se incubaron luego a 37°C con 5% de CO₂ durante 3-3,5 horas.
50

Después de la transfección, se eliminó el medio de transfección y se añadieron a las células 8 ml de medio completo nuevo. Las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ durante aproximadamente 60 horas. Después las células fueron cosechadas para su uso en un ensayo FACS estándar usando ristocetina.
55

Para FACS, se añadieron a la placa aproximadamente 50 μ l de una dilución 1:10 de plasma pobre en plaquetas (PPP; fuente de VWF) en el tampón para ensayo y se diluyó en serie 1: 2 hasta la dilución final de 1: 80. Se usó como patrón ISTH Lot nº 3 (GTI; Milwaukee, WI) y se diluyó 1: 10 en tampón para ensayo y se diluyó en serie 1: 2 hasta una dilución final de 1: 320. La placa se incubó después durante una hora a temperatura ambiente. Después de una hora de incubación, la placa se centrifugó de nuevo a 1200 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante.

En algunos experimentos, el PPP se diluyó en PBS que contenía BSA al 1% y 1 mg/ml de ristocetina A (American Biochemical & Pharmaceuticals, Ltd., Marlton, NJ) o bien 1 mg/ml de Botrocetina (Sigma Aldrich).

Se diluyeron anticuerpos marcados fluorescentemente (anti-GPIIb α , Blood Research Institute) hasta una concentración final de 5 μ g/ml en tampón para ensayo. El anti-VWF policlonal marcado fluorescentemente también se diluyó hasta una concentración final de 5 μ g/ml en tampón para ensayo y se añadió a células transfectadas incubadas en PPP. Se añadieron IgG de conejo normal (NRIgG; Pierce) y AP-1 a una concentración de 5 μ g/ml a células transfectadas como controles negativo y positivo, respectivamente. La placa se incubó en la oscuridad durante una hora a temperatura ambiente. Se añadió tampón para ensayo a cada pocillo para llevar el volumen final hasta 150 μ l, y se llevó a cabo FACS usando un sistema LSR II BD (Becton Dickinson). Los resultados se muestran en unidades VWF: IbCo.

Resultados: como se muestra en la FIG. 2A, las células HEK-293T transfectadas simuladas (*mock*) no mostraron ninguna unión en presencia de ristocetina, mientras que las células que expresaban GPIIb α de tipo silvestre mostraron una disminución dependiente de la concentración en la unión a ristocetina después de 1,2 mg/ml. Las células HEK-293T que expresan solo una de las mutaciones de GPIIb α mostraron una sensibilidad aumentada incluso a bajas concentraciones de ristocetina, lo que sugiere que la unión es independiente de la ristocetina. Las células que expresan dos mutaciones de GPIIb α mostraron una sensibilidad extrema a la ristocetina o, alternativamente, un aumento de la unión espontánea que era independiente de la ristocetina. Las células HEK-293T que expresan la mutación triple de GPIIb α (es decir, G233V/D235Y/M239V), sin embargo, no mostraron un aumento de la sensibilidad/unión espontánea con relación a los dobles mutantes. Como se muestra en la FIG. 2B, cada uno de los mutantes dobles (es decir, G233V/M239V, G233V/D235Y o D235Y/M239V) mostró una unión espontánea comparable relativa entre sí que no se vio significativamente afectada por la ristocetina (es decir, sin ristocetina). Como se esperaba, el control de tipo silvestre mostró aumentos dependientes de la concentración en VWF:IbCo a ristocetina. Como se muestra en la FIG. 2C, VWF:IbCo no se ve afectado por el tipo de agonista de la agregación de plaquetas, ya que ninguno de los dobles mutantes estaba significativamente afectado por la botrocetina (es decir, sin botrocetina). Como se esperaba, el control de tipo silvestre mostró aumentos dependientes de la concentración en VWF: IbCo a botrocetina.

Ejemplo 2: Función de VWF en muestras de pacientes usando GPIIb α mutante en FACS.

Métodos: Células HEK293T se transfectaron transitoriamente con un constructo GPIIb α de tipo silvestre o GPIIb α que codifica uno de los mutantes dobles, como se describió anteriormente. Las células fueron transfectadas adicionalmente con los constructos GPIIb β y GP-IX. Un grupo de células HEK-293T fueron transfectadas simuladamente, como se describió anteriormente.

Después de cuarenta y ocho horas, las células transfectadas se recogieron de la placa con EDTA 3 mM, se resuspendieron en tampón para ensayos (es decir, 1x PBS que contenía BSA al 2%) y se contaron. No se usó tripsina, ya que potencialmente puede escindir GPIIb α de la superficie celular. Después del recuento, $1,75 \times 10^5$ células se cultivaron en placas de 96 pocillos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N. J.) como forma de estandarizar GPIIb α en la superficie de la placa, y después la placa se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las células. El sobrenadante fue desechado.

Las células HEK-293T que expresan las mutaciones GPIIb α se usaron en ensayos de citometría de flujo para probar la unión con VWF, que se midió con un anticuerpo policlonal anti-VWF marcado fluorescentemente de Dako. Se desarrolló una curva normal usando diluciones en serie de plasma de referencia previamente estandarizadas frente a los patrones de VWF ISTH y WHO basados en el patrón internacional VWF: Ag que también está estandarizado para VWF: RCo.

En un conjunto de experimentos, se usaron muestras de pacientes normales para determinar si las células HEK-293T requirieron todos los componentes del receptor de adhesión de plaquetas o simplemente GPIIb α . Se usaron muestras de pacientes normales. En otro conjunto de experimentos, se usaron muestras de pacientes de individuos normales y de individuos con VWD en el ensayo FACS como se describió anteriormente en el Ejemplo 2.

Las muestras incluían 41 normales, 16 VWD de plasma tipo 2M, 5 VWD tipo 2 y 5 VWD tipo 2. Se incluyeron individuos con VWD tipo 2M aparente, pero sin síntomas clínicos, y afroamericanos con una relación reducida de VWF: RCo/VWF: Ag (RCo/Ag). De las 16 muestras de VWD de tipo 2M, 7 habían reducido notablemente el VWF: IbCo (coherente con el ensayo VWF: RCo), y 9 tenían VWF: IbCo normal. Los afroamericanos con SNPs asociados con una proporción RCo/Ag reducida tenían ensayos VWF: IbCo que se correlacionaron con su VWF: Ag en contraste con las relaciones anormales RCo/Ag identificadas mediante ensayos estándar. Los individuos de tipo 2A

exhibieron ensayos reducidos de VWF: IbCo y el tamaño del multímero pareció correlacionarse con la actividad de VWF: IbCo. Así pues, la medida de la función VWF usando el ensayo VWF: IbCo se correlaciona más directamente con la función de VWF y evita algunos de los inconvenientes y la variabilidad funcional de los ensayos VWF: RCo.

5 Resultados: Como se muestra en la Tabla 2, no se requieren GPIIb β y GP-IX para la expresión superficial de GPIIb α mutante, ya que los resultados de FACS de células HEK-293T que expresan componentes múltiples del receptor de adhesión a la placa no fueron significativamente diferentes de las células que expresan solo GPIIb α .

Tabla 2: Efecto de GPIIb α que tiene una mutación doble con o sin los otros componentes del receptor de adhesión de las plaquetas en un FACS.

Muestra	VWF:RCo conocido (UI/dL)	GPIIb α (G233V/M239V), GPIIb β y IX	GPIIb α	% Dif. entre transfecciones	% Dif. entre GPIIb α , GPIIb β y IX y conocido	% Dif. entre GPIIb α , y conocido
ISTH 2	71	70,4	70,3	0,1	0,4	0,5
ISTH 3	86	86,9	91,4	2,5	0,5	3,0
CCNRP	82 to 103	89,0	74,6	8,8	4,1	4,7
Cntrl 3	65	64,4	52,1	10,5	0,5	11,0
Cntrl 4	24,6	26,7	22,7	8,0	4,0	4,1
JS	0	0	0	0	0	0
XX-01	200	136,4	119,5	6,6	18,9	25,2

ISTH = muestra de referencia

10 Como se muestra a continuación en la Tabla 3, el ensayo FACS tuvo como resultado medidas de VWF comparables a las de un método utilizado en laboratorios clínicos. Las muestras fueron individuos normales e individuos que tienen VWD. La Tabla 4 es similar a la Tabla 3, excepto que las muestras eran de individuos normales y de individuos con VWD de tipo 2. La Tabla 5 es también similar a la Tabla 3, excepto que las muestras eran de individuos que tenían VWD Tipo 2M.

15 Tabla 3: Resumen de VWF:IbCo por FACS en muestras de plasma de afroamericanos y caucásicos con y sin polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) de VWF.

Muestra	VWF:Ag 1	VWF:RCo	Rel, 1	VWF:Ag 2	VWF:IbCo	Rel, 2	Rel, 2/Rel, 1
IN-09	215	104	0,484	167	131	0,781	0,608
XX-22	193	140	0,725	152	240	1,579	1,244
XX-24	278	225	0,809	233	240	1,029	0,863
XX-27	195	130	0,667	186	147	0,788	0,753
XX-29	85	74	0,871	79	104	1,313	1,222
AT-09	103	69	0,670	88	78	0,886	0,756
AT-13	71	72	1,014	72	89	1,226	1,251
AT-14	257	248	0,965	231	233	1,009	0,906
AT-17	225	95	0,422	188	144	0,768	0,641
AT-18	225	195	0,867	186	155	0,834	0,689
XX-21	85	92	1,082	90	72	0,801	0,844
AT-06	154	176	1,143	150	--	--	--
IN-15	122	85	0,697	83	140	1,685	1,146
PB-06	86	88	1,023	78	137	1,755	1,594
PB-14	234	211	0,902	238	197	0,831	0,843
PB-17	109	93	0,853	104	68	0,649	0,620

ES 2 672 320 T3

Muestra	VWF:Ag 1	VWF:RCo	Rel, 1	VWF:Ag 2	VWF:IbCo	Rel, 2	Rel, 2/Rel, 1
AT-16	82	94	1,146	73	94	1,284	1,143
AT-19	164	151	0,921	147	126	0,859	0,771
AT-42	86	69	0,802	70	64	0,902	0,739
NO-53	243	252	1,037	239	159	0,666	0,655
DT-08	68	71	1,044	58	62	1,064	0,910
DT-01	88	107	1,216	91	82	0,906	0,937
DT-06	82	79	0,963	83	82	0,981	0,995
XX-04	96	109	1,135	86	128	1,481	1,334
XX-06	129	149	1,155	111	128	1,148	0,993
XX-13	124	169	1,363	114	186	1,638	1,503
IN-13	103	92	0,893	100	88	0,887	0,859
IN-22	96	110	1,146	104	65	0,627	0,678
PB-09	88	78	0,886	100	77	0,767	0,870
XX-03	106	136	1,283	103	160	1,551	1,511
XX-12	137	183	1,336	128	189	1,437	1,380
XX-14	115	163	1,417	109	--	--	--
XX-15	123	137	1,114	159	122	0,768	0,992
IN-01	209	220	1,053	149	--	--	--
IN-03	71	68	0,958	68	54	0,801	0,762
IN-07	95	85	0,895	77	76	0,995	0,802
PB-01	84	77	0,917	82	71	0,862	0,805
PB-04	155	162	1,045	146	105	0,722	0,678
PB-20	107	114	1,065	91	95	1,046	0,855
NO-23	--	--	--	143	<1,1	--	--

1 = método DT (un método de laboratorio clínico)
 2 = método BRI (método del Blood Research Institute)
 Área recuadrada = < 0,81

Tabla 4: VWF:lbCo por FACS en plasma procedente de afroamericanos y caucásicos con/sin VWD Tipo 2 y repeticiones.

Muestra	Raza	VWD Fenotipo	VWF Mutación	VWF:Ag	VWF:RCo	RCo/Ag	FACS1	FACS1/Ag	FACS2	FACS2/Ag
DB	AA	"2M"	3 AA snps	86	47	0,547	78	0,910	78	0,905
MK0055	AA	"2M"	P1467S	257	36	0,140	214	0,833	184	0,718
LJ	C	"2M"	3 AA snps	66	40	0,606	180	2,734	48	0,735
IN0061		2M	R1374C	22	11	0,500	4	0,204	10	0,432
RH		2B	R1308S	43	37	0,860	67	1,558	67	1,557
LB		2B	V1316M	91	62	0,681	159	1,751	106	1,162
SB		2B	V1316M	27	12	0,444	36	1,347	25	0,914
AJ		2B	H1268D	21	17	0,810	31	1,484	41	1,959
PB0068		2B	R1306W	23	13	0,565	--	--	25	1,065
YG		2A	L1503P	26	13	0,500	--	--	19	0,714
AV		2A	G1579R	46	16	0,348	--	--	1	0,028
AT0021		2A	M7401?	31	12	0,387	--	--	18	0,574
AT0032		2A	I1628T	120	32	0,267	--	--	103	0,586
IA0001		2A	R1597W	33	<10	--	--	--	8	0,247
AT0017	AA	NL	3 AA snps	225	95	0,422	144	0,641	156	0,695
XX0027	AA	NL	3 AA snps	195	130	0,677	147	0,753	116	0,595
XX0004	C	NL	--	96	109	1,135	128	1,334	114	1,183
XX0013	C	NL	--	124	169	1,363	186	1,503	105	0,843
PB0014	AA	NL	--	234	211	0,902	197	0,843	213	0,909
AT0042	AA	NL	--	86	69	0,802	64	0,739	91	1,056

AA = afroamericano

C = caucásico

NL = normal

"2M" = tipo 2M aparente

Tabla 5: Función VWF en el plasma de afroamericanos y caucásicos con/sin VWD Tipo 2 M.

Muestra	Raza	VWD Fenotipo	VWF Mutación	VWF:Ag 1	VWF:R Co 1	RCo/Ag 1	FACS2	FACS2/Ag
TB	C	"2M"	--	127	87	0,69	87	0,69
DB	AA	"2M"	3 AA snps	86	47	0,55	78	0,91
AC	C	2M	G13242S	95	13	0,14	<1,1	--
BF	--	2M	I1416T (new)	89	31	0,35	36	0,41
MG	H	2M	I1425F	45	16	0,36	>1,1	--
LG	C	2M	E1359K	67	37	0,55	27	0,41
GI	--	2M	D1283H (new)	16	4	0,25	<1,1	--
KJ	C	2M	--	12	3	0,25	<1,1	--
LJ	AA	"2M"	3 AA snps	66	40	0,61	180	2,73
BM	C	2M	I1426T	156	43	0,28	93	0,60
AR	--	2M	R1374L	48	10	0,21	<1,1	--
DR	AA	"2M"	R1342C; I1343V; 1301- 3103 del; y R2185Q	38	12	0,32	37	0,97
MK0038	C	2M	R1392-Q1402 del	47	11	0,23	<1,1	--
IN0061	C	2M	R1374C	22	11	0,50	4	0,20
MK0055	AA	"2M"	P1467S	257	36	0,14	214	0,83
MK0058	AA	"2M"	P1467S	265	68	0,14	194	0,73
AA = afroamericano C = caucásico H = hispánico								

Resultados: como se muestra en la FIG. 4, los individuos con VWF normal mostraron un aumento típico en la fluorescencia media con diluciones de su plasma más bajas. Como era de esperar, los individuos con VWD Tipo 3 mostraron cambios en la fluorescencia media porque su plasma tiene un VWF bajo o nulo.

- 5 Como se muestra en la FIG. 5, los individuos con VWD tipo 2B mostraron un aumento mucho más temprano en la fluorescencia media en comparación con los normales, comenzando a diluciones muy altas de su plasma (es decir, > 1/100). La VWD Tipo 2B se caracteriza por tener mutaciones de ganancia de función. Nuevamente, los individuos con VWD Tipo 3 no mostraron reacción en el ensayo.

- 10 Como se muestra en la FIG. 6, los individuos con VWD Tipo 2M no mostraron aumento en la fluorescencia media en comparación con los normales. La VWD Tipo 2M se caracteriza por VWF defectuoso que no interactúa con GPIIb/IIIa. Los individuos con tipo 2M aparente ("2M") mostraron un aumento mucho más temprano en la fluorescencia media en comparación con los normales, comenzando en diluciones muy altas de su plasma (es decir, > 1/100). El tipo 2M aparente se caracteriza por un bajo VWF:RCo/VWF:Ag, pero niveles normales de VWF. Tampoco en este caso los individuos con VWD Tipo 3 mostraron reacción en el ensayo.

- 15 Ejemplo 3: Función de GPIIb/IIIa mutante en ELISA.

- 20 Se transfectaron de forma estable células S2 (Invitrogen) con un constructo GPIIb/IIIa mutante, un constructo GPIIb/IIIa de tipo silvestre y un constructo GP-IX. En algunos experimentos las células S2 se transfectaron con constructos GPIIb/IIIa que tenían una mutación C65A y una mutación ΔTM290. La mutación C65A eliminó una cisteína que podría permitir la dimerización de GPIIb/IIIa; y la mutación ΔTM290 eliminó la región transmembrana de modo que la proteína expresada se excretó.

Brevemente, los constructos fueron clonados en un vector de secreción pMT/Bip/V5-His:GPIIb/IIIa C65A, D235Y, M239V ΔTM290 o pMT/Bip/V5-His: GPIIb/IIIa C65A ΔTM290 (Invitrogen). El día 1, las células S2 se contaron y se sembraron en un plato de 35 mm o en un pocillo de una placa de 6 pocillos a razón de 3 x 10⁶ células en 3 ml de

- medio completo (Ex-Cell 420 + 10% FBS + 7 mM L-Glutamina) . Las células se dejaron crecer 6-8 horas a 28°C. A un conjunto de tubos se añadió lo siguiente: Solución A, que contenía 36 µl de CaCl₂ 2 M, 19 µg de ADN de plásmido (purificado con Qiagen Maxi Kit; Qiagen; Valencia, CA), 1 µg de pCoBlast (vector de selección) y ddH₂O hasta 300 µl. A otro conjunto de tubos se añadió lo siguiente: Solución B, que contenía 300 µl de 2 x solución salina tamponada con HEPES. La solución A se añadió lentamente gota a gota a la solución B mientras se agitaba suavemente en vórtice. Las soluciones combinadas fueron después incubadas a temperatura ambiente durante 30-40 minutos hasta que se formó un precipitado fino.
- 5 La solución mixta se añadió gota a gota a las células incubadas en placa mientras se removía la placa suavemente. Las células se incubaron a continuación durante la noche a 28°C (aproximadamente 16-24 horas).
- 10 Al día siguiente, la solución de transfección se eliminó y se reemplazó con 3 ml de medio completo fresco y se incubó a 28°C sin CO₂. El día 5, las células se resuspendieron y se transfirieron a un tubo cónico de 15 cc, se centrifugaron a 2400 rpm durante 2 minutos. El medio se decantó y las células se resuspendieron en 3 ml de medio estable (medio completo + 25 µg/ml de Blastidin-S) y se incubaron en un nuevo plato o pocillo.
- 15 La selección comenzó en la semana 2. Como se hizo el día 5, el medio de selección se reemplazó cada 3-4 días con 3 ml de medio de selección fresco. La selección y la expansión continuaron durante la semana 3. Durante este tiempo, las células se resuspendieron, se transfirieron a tubos cónicos de 15 cc y se centrifugaron a 2400 rpm durante 2 minutos. Los medios se decantaron y las células se resuspendieron en 5 ml de medio selector y se cultivaron en placa en un matraz T25 nuevo. Al cabo de 4 días, las células se expandieron de 1 T25 a 2 matraces T25.
- 20 Las existencias de expansión y congelación comenzaron en la semana 4. Las células se expandieron desde los matraces T25 hasta los matraces T75 (3 x 10⁶ células/ml de medio). Los matraces T75 recibieron 15 ml de medio, lo que era aproximadamente 45 x 10⁶ células. Las células restantes (aproximadamente 2 x 10⁷ células/vial) se congelaron y se almacenaron en nitrógeno líquido.
- 25 La inducción de las células en los matraces T75 comenzó en la semana 5. Las células se resuspendieron, se transfirieron a un tubo cónico de 15 cc para el recuento, y se centrifugaron. Se resuspendieron 45 x 10⁶ células en 15 ml de medio de inducción (medio estable + CuSO₄ 500 µM) y se transfirieron a matraces T75. Las células se incubaron después 4 días a 28°C, y el sobrenadante que tenía GPIIb₃ segregada fue recolectado.
- 30 Como se muestra en la Tabla 6 y en la FIG. 3, varias superficies de fase sólida fueron primero probadas para los ensayos ELISA. La Tabla 6 muestra que la densidad superficial de GPIIb₃ estaba afectada por la carga superficial de la superficie de fase sólida, mientras que la FIG. 3 muestra que diferentes superficies de fase sólida revestidas con GPIIb₃ que tienen una doble mutación afectan a la unión de VWF. La carga superficial de fase sólida parece afectar a la unión de GPIIb₃/VWF, sugiriendo que cualquier superficie de fase sólida debe analizarse primero en relación con su capacidad de (1) proporcionar una densidad uniforme de GPIIb₃ y (2) de permitir que VWF se una a GPIIb₃.
- 35 Después de considerar tanto la Tabla 6 como la FIG. 3, las placas Immulon® 4 HBX funcionaron mejor y se usaron en adelante.

Tabla 6: Efecto de varias superficies de fase sólida sobre la concentración de Doble Mutación GPIIb₃ (G233V/M239V) (las mismas muestras en placas diferentes).

Superficie de fase sólida	Característica de la superficie	Concentraciones de GPIIb ₃ calculadas
Immulon 1	Hidrófobo	635,1
Immulon 2	Hidrófobo	370,8
Immulon 4	Máximo	383,7
Polysorb	Hidrófobo	321,7
Corning medio	Hidrófobo	576,8
Corning alto	Iónico y/o hidrófobo	414,7
Multisorb	Moléculas polares	no unión
Maxisorb	Hidrófobo/hidrófilo	408,5

- Una placa Immulon® 4 HBX Plate (Thermo Scientific; Waltham, MA) fue recubierta con anticuerpo monoclonal anti-GPIIb₃ 142.16 (Blood Research Institute) a una concentración de 5 µg/ml, que después se incubó durante la noche a 4°C. La placa se bloqueó con PBS que contenía 1% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas expresadas en S2 purificadas con níquel - GPIIb₃ C65A, D235Y, M239V y ΔTM290 - se diluyeron en PBS que contenía 1% de BSA y se incubaron en la placa recubierta con anticuerpo anti-GPIIb₃ durante 1 hora a 37°C. Véase, Celikel et al., *supra*.
- 40

ES 2 672 320 T3

5 El PPP de controles o individuos que tienen VWD se diluyó 1:50 en PBS que contenía 1% de BSA y se diluyó en serie 1: 2 hasta una dilución final de 1:100. El PPP diluido se añadió a la placa y se incubó durante 1 hora a 37°C. El lote N° 3 de ISTH se utilizó de nuevo como patrón, empezando las diluciones de curva a 1:25 en tampón de sustrato, que luego se diluyó en serie 1: 2 a una dilución final de 1:1600. Se añadieron 2 µg/ml de AVW-1 biotinilada y AVW-15 (Blood Research Institute) a la placa y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, se añadió a la placa fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Ltd., West Grove, PA.), diluido 1:5000 en tampón para sustrato, y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Se diluyó 1: 100 p-nitrofenil fosfato (PNPP; Invitrogen), un sustrato de fosfato alcalino, en tampón para sustrato y se añadió a la placa. La placa se leyó a 405/650 nm en un lector de placas. La placa se lavó tres veces entre cada etapa con PBS que contenía Tween-20 al 0,05%.

10

Resultados: como se muestra en las Tablas 7 y 8, los individuos con VWF normal mostraron resultados de ELISA similares al margen tanto si se añadió ristocetina al ensayo como si no se hizo. Además, el ensayo ELISA dio como resultado medidas de VWF comparables a un método utilizado en laboratorios clínicos.

Tabla 7: Resumen de VWF:IbCo mediante ELISA en muestras de plasma de afroamericanos y caucásicos con y sin polimorfismos de nucleótidos simples VWF (SNPs).

Sujeto	VWF:Ag	IbCo ELISA	Ristocetina ELISA	IbCo/VWF:Ag	Ris/VWF:Ag	VWF:Ag clínico	VWF.RCo	VWF:RCo/VWF:Ag
ISTH 3 A	121,25	109,4	127,3	0,90	1,05	106	86	0,81
ctrl 5 (70%)	75,62	68,97	69,68	0,91	0,92	74,2	60,2	0,81
ctrl 6 (35%)	32,28	31,12	28,76	0,96	0,89	37,1	30,1	0,81
CCNRP 7122 A	94,56	84,6	73,34	0,89	0,78	114	71	0,62
ISTH 3 B	96,71	99,71	104,05	1,03	1,08	106	86	0,81
MK0038	33,44	1,41	14,16	0,04	0,42	47	11	0,23
XX0017	139,5	157,35	169,5	1,13	1,22	206	200	0,97
JS	0	0,5	0,99	0,00	0,00	<1	<10	0,00
ctrl 8 (30%)	23,84	26,96	23,58	1,13	0,99	31,8	25,8	0,81
ISTH 3 C	85,14	94,42	90,48	1,11	1,06	106	86	0,81
CCNRP 7122 B	59,61	60,64	55,44	1,02	0,93	114	71	0,62
AT0068	70,4	59,18	31,47	0,84	0,45	99	57	0,58

ES 2 672 320 T3

Tabla 8: Resumen de VWF:IbCo mediante ELISA en muestras de plasma de afroamericanos y caucásicos con y sin polimorfismos de nucleótidos simples VWF (SNPs).

Sujeto	VWF:Ag clínico	BRI VWF:Ag	VWF:RCo clínico	IbCo ELISA	Ristocetina ELISA	VWF:RCo/V WF:Ag clínico	IbCo ELISA/BRI VWF:Ag
AA w/1380 + 1435 + 1472							
HN	334	228	165	165	--	0,494	0,725
XX	278	228	225	235	222	0,809	1,029
AT	257	309	248	234	220	0,965	0,759
AT	225	159	198	149	152	0,880	0,932
AT	225	172	95	67	106	0,422	0,393
IN	215	179	104	77	73	0,484	0,429
XX	193	200	140	123	154	0,725	0,616
NO	179	178	180	171	--	1,006	0,960
AT	103	83	69	58	64	0,670	0,701
XX	85	67	74	73	57	0,871	1,095
AT	71	65	72	70	53	1,014	1,077
HN	67	77	54	54	--	0,806	0,704
AA solo w/1472							
NO	259	209	224	151	213	0,865	0,723
XX	195	129	130	118	132	0,667	0,910
XX	185	143	154	143	183	0,832	1,001
XX	167	172	170	123	198	1,018	0,714
NO	166	151	175	155	--	1,054	1,025
IN	153	123	146	120	55	0,954	0,970
NO	144	141	85	92	--	0,590	0,652
DT	141	--	121	--	--	0,858	--
HN	139	--	98	--	--	0,705	--
XX	137	112	123	90	151	0,898	0,801
HN	136	136	113	106	--	0,831	0,784
XX	122	89	85	75	--	0,697	0,839
XX	116	103	89	82	81	0,767	0,793
XX	110	104	91	100	62	0,827	0,967
IN	108	107	101	86	94	0,935	0,800
AT	99	91	57	50	25	0,576	0,550
DT	98	89	85	79	85	0,867	0,885
AT	84	96	79	82	63	0,940	0,856
AA w/ no SNPs							
NO	243	237	252	217	--	1,037	0,917
PB	234	192	211	110	83	0,902	0,576

ES 2 672 320 T3

Sujeto	VWF:Ag clínico	BRI VWF:Ag	VWF:RCo clínico	IbCo ELISA	Ristocetina ELISA	VWF:RCo/V WF:Ag clínico	IbCo ELISA/BRI VWF:Ag
DT	224	185	167	190	--	0,746	1,025
AT	199	178	193	177	--	0,970	0,993
NO	195	179	220	207	233	1,128	1,160
AT	164	132	151	98	96	0,921	0,743
AT	154	139	176	159	135	1,143	1,143
IN	122	76	85	68	74	0,697	0,897
PB	109	91	93	76	63	0,853	0,832
PB	86	63	88	64	52	1,023	1,025
AT	86	107	97	68	63	1,128	0,633
AT	86	57	69	60	56	0,802	1,055
XX	85	79	92	65	44	1,082	0,817
AT	82	93	94	70	49	1,146	0,750
C w/ 1380 + 1435 + 1472							
PB	180	144	149	122	115	0,828	0,842
IN	94	91	84	68	79	0,894	0,747
C w/ 1472 solo							
XX	206	254	200	266	251	0,971	1,050
IN	192	137	144	133	126	0,750	0,973
DT	174	148	137	165	127	0,787	1,119
IN	171	106	122	94	127	0,713	0,888
PB	129	102	85	76	66	0,659	0,751
IN	111	88	99	76	78	0,892	0,861
XX	97	67	89	82	80	0,918	1,224
HN	94	103	82	82	--	0,872	0,791
IN	91	65	88	58	51	0,967	0,902
C w/ no SNPs							
PB	289	313	256	309	292	0,886	0,988
IN	237	171	255	154	275	1,076	0,901
IN	187	165	138	124	144	0,738	0,753
XX	129	121	149	90	112	1,155	0,745
XX	124	128	169	137	127	1,363	1,073
IN	103	82	92	67	78	0,893	0,815
IN	100	71	91	68	72	0,910	0,957
XX	96	93	109	132	103	1,135	1,425
IN	96	86	110	94	87	1,146	1,086
XX	94	77	101	74	83	1,074	0,972
XX	94	100	86	88	93	0,915	0,875

Sujeto	VWF:Ag clínico	BRI VWF:Ag	VWF:RCo clínico	IbCo ELISA	Ristocetina ELISA	VWF:RCo/V WF:Ag clínico	IbCo ELISA/BRI VWF:Ag
DT	88	90	107	91	83	1,216	1,008
PB	88	79	78	50	54	0,886	0,628
IN	85	61	77	58	57	0,906	0,961
IN	85	74	82	65	56	0,965	0,872
PB	83	80	88	60	51	1,060	0,742
DT	82	73	79	65	63	0,963	0,891
PB	74	52	69	53	34	0,932	1,017
DT	68	57	71	55	56	1,044	0,956
XX	58	54	61	52	49	1,052	0,958

AA = afroamericano

C = caucásico

Así pues, las medidas de la función VWF usando un VWF:IbCo FACS o un ensayo ELISA se correlacionan más directamente con la función VWF y evita algunos de los fallos y la variabilidad funcional que se observan con los ensayos VWF:RCo.

Listado de secuencias

- 5 <110> BLOODCENTER OF WISCONSIN, INC.
- <120> Métodos y kits para la medida del factor de von Willebrand
- <130> N110492
- <140> EP 08798536.2
- <141> 22-08-2008
- 10 <150> US 60/957,604
- <151> 23-08-2007
- <160> 10
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 15 <211> 2463
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- 20 <222> (76)..(1995)
- <400> 1

ES 2 672 320 T3

gagagaagga cggagtcgag tggcacccta gaagacgctc tgtgccttcg gaggtctttc	60
tgcctgcctg tcctc atg cct ctc ctc ctc ttg ctg ctc ctg ctg cca agc	111
Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ser	
1 5 10	
ccc tta cac ccc cac ccc atc tgt gag gtc tcc aaa gtg gcc agc cac	159
Pro Leu His Pro His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His	
15 20 25	
cta gaa gtg aac tgt gac aag agg aat ctg aca gcg ctg cct cca gac	207
Leu Glu Val Asn Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp	
30 35 40	
ctg ccg aaa gac aca acc atc ctc cac ctg agt gag aac ctc ctg tac	255
Leu Pro Lys Asp Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr	
45 50 55 60	
acc ttc tcc ctg gca acc ctg atg cct tac act cgc ctc act cag ctg	303
Thr Phe Ser Leu Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu	
65 70 75	
aac cta gat agg tgc gag ctc acc aag ctc cag gtc gat ggg acg ctg	351
Asn Leu Asp Arg Cys Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu	
80 85 90	
cca gtg ctg ggg acc ctg gat cta tcc cac aat cag ctg caa agc ctg	399
Pro Val Leu Gly Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu	
95 100 105	
ccc ttg cta ggg cag aca ctg cct gct ctc acc gtc ctg gac gtc tcc	447
Pro Leu Leu Gly Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser	
110 115 120	

ES 2 672 320 T3

ttc aac cgg ctg acc tcg ctg cct ctt ggt gcc ctg cgt ggt ctt ggc 495
 Phe Asn Arg Leu Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly
 125 130 135 140

gaa ctc caa gag ctc tac ctg aaa ggc aat gag ctg aag acc ctg ccc 543
 Glu Leu Gln Glu Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Leu Lys Thr Leu Pro
 145 150 155

cca ggg ctc ctg acg ccc aca ccc aag ctg gag aag ctc agt ctg gct 591
 Pro Gly Leu Leu Thr Pro Thr Pro Lys Leu Glu Lys Leu Ser Leu Ala
 160 165 170

aac aac aac ttg act gag ctc ccc gct ggg ctc ctg aat ggg ctg gag 639
 Asn Asn Asn Leu Thr Glu Leu Pro Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Glu
 175 180 185

aat ctc gac acc ctt ctc ctc caa gag aac tcg ctg tat aca ata cca 687
 Asn Leu Asp Thr Leu Leu Leu Gln Glu Asn Ser Leu Tyr Thr Ile Pro
 190 195 200

aag ggc ttt ttt ggg tcc cac ctc ctg cct ttt gct ttt ctc cac ggg 735
 Lys Gly Phe Phe Gly Ser His Leu Leu Pro Phe Ala Phe Leu His Gly
 205 210 215 220

aac ccc tgg tta tgc aac tgt gag atc ctc tat ttt cgt cgc tgg ctg 783
 Asn Pro Trp Leu Cys Asn Cys Glu Ile Leu Tyr Phe Arg Arg Trp Leu
 225 230 235

cag gac aat gct gaa aat gtc tac gta tgg aag caa ggt gtg gac gtc 831
 Gln Asp Asn Ala Glu Asn Val Tyr Val Trp Lys Gln Gly Val Asp Val
 240 245 250

aag gcc atg acc tct aat gtg gcc agt gtg cag tgt gac aat tca gac 879
 Lys Ala Met Thr Ser Asn Val Ala Ser Val Gln Cys Asp Asn Ser Asp
 255 260 265

aag ttt ccc gtc tac aaa tac cca gga aag ggg tgc ccc acc ctt ggt 927
 Lys Phe Pro Val Tyr Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Cys Pro Thr Leu Gly
 270 275 280

gat gaa ggt gac aca gac cta tat gat tac tac cca gaa gag gac act 975
 Asp Glu Gly Asp Thr Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp Thr
 285 290 295 300

gag ggc gat aag gtg cgt gcc aca agg act gtg gtc aag ttc ccc acc 1023
 Glu Gly Asp Lys Val Arg Ala Thr Arg Thr Val Val Lys Phe Pro Thr
 305 310 315

aaa gcc cat aca acc ccc tgg ggt cta ttc tac tca tgg tcc act gct 1071
 Lys Ala His Thr Thr Pro Trp Gly Leu Phe Tyr Ser Trp Ser Thr Ala
 320 325 330

tct cta gac agc caa atg ccc tcc tcc ttg cat cca aca caa gaa tcc 1119
 Ser Leu Asp Ser Gln Met Pro Ser Ser Leu His Pro Thr Gln Glu Ser
 335 340 345

act aag gag cag acc aca ttc cca cct aga tgg acc cca aat ttc aca 1167
 Thr Lys Glu Gln Thr Thr Phe Pro Pro Arg Trp Thr Pro Asn Phe Thr
 350 355 360

ctt cac atg gaa tcc atc aca ttc tcc aaa act cca aaa tcc act act 1215
 Leu His Met Glu Ser Ile Thr Phe Ser Lys Thr Thr Pro Lys Ser Thr Thr
 365 370 375 380

ES 2 672 320 T3

gaa cca acc cca agc ccg acc acc tca gag ccc gtc ccg gag ccc gcc 1263
 Glu Pro Thr Pro Ser Pro Thr Thr Ser Glu Pro Val Pro Glu Pro Ala
 385 390 395

cca aac atg acc acc ctg gag ccc act cca agc ccg acc acc cca gag 1311
 Pro Asn Met Thr Thr Leu Glu Pro Thr Pro Ser Pro Thr Thr Pro Glu
 400 405 410

ccc acc tca gag ccc gcc ccc agc ccg acc acc ccg gag ccc acc tca 1359
 Pro Thr Ser Glu Pro Ala Pro Ser Pro Thr Thr Pro Glu Pro Thr Ser
 415 420 425

gag ccc gcc ccc agc ccg acc acc ccg gag ccc acc cca atc ccg acc 1407
 Glu Pro Ala Pro Ser Pro Thr Thr Pro Glu Pro Thr Pro Ile Pro Thr
 430 435 440

atc gcc aca agc ccg acc atc ctg gtg tct gcc aca agc ctg atc act 1455
 Ile Ala Thr Ser Pro Thr Ile Leu Val Ser Ala Thr Ser Leu Ile Thr
 445 450 455 460

cca aaa agc aca ttt tta act acc aca aaa ccc gta tca ctc tta gaa 1503
 Pro Lys Ser Thr Phe Leu Thr Thr Thr Lys Pro Val Ser Leu Leu Glu
 465 470 475

tcc acc aaa aaa acc atc cct gaa ctt gat cag cca cca aag ctc cgt 1551
 Ser Thr Lys Lys Thr Ile Pro Glu Leu Asp Gln Pro Pro Lys Leu Arg
 480 485 490

ggg gtg ctc caa ggg cat ttg gag agc tcc aga aat gac cct ttt ctc 1599
 Gly Val Leu Gln Gly His Leu Glu Ser Ser Arg Asn Asp Pro Phe Leu
 495 500 505

cac ccc gac ttt tgc tgc ctc ctc ccc ctg ggc ttc tat gtc ttg ggt 1647
 His Pro Asp Phe Cys Cys Leu Leu Pro Leu Gly Phe Tyr Val Leu Gly
 510 515 520

ctc ttc tgg ctg ctc ttt gcc tct gtg gtc ctc atc ctg ctg ctg agc 1695
 Leu Phe Trp Leu Leu Phe Ala Ser Val Val Leu Ile Leu Leu Leu Ser
 525 530 535 540

tgg gtt ggg cat gtg aaa cca cag gcc ctg gac tct ggc caa ggt gct 1743
 Trp Val Gly His Val Lys Pro Gln Ala Leu Asp Ser Gly Gln Gly Ala
 545 550 555

gct ctg acc aca gcc aca caa acc aca cac ctg gag ctg cag agg gga 1791
 Ala Leu Thr Thr Ala Thr Gln Thr Thr His Leu Glu Leu Gln Arg Gly
 560 565 570

cgg caa gtg aca gtg ccc cgg gcc tgg ctg ctc ttc ctt cga ggt tcg 1839
 Arg Gln Val Thr Val Pro Arg Ala Trp Leu Leu Phe Leu Arg Gly Ser
 575 580 585

ctt ccc act ttc cgc tcc agc ctc ttc ctg tgg gta cgg cct aat ggc 1887
 Leu Pro Thr Phe Arg Ser Ser Leu Phe Leu Trp Val Arg Pro Asn Gly
 590 595 600

cgt gtg ggg cct cta gtg gca gga agg agg ccc tca gct ctg agt cag 1935
 Arg Val Gly Pro Leu Val Ala Gly Arg Arg Pro Ser Ala Leu Ser Gln
 605 610 615 620

ggt cgt ggt cag gac ctg ctg agc aca gtg agc att agg tac tct ggc 1983
 Gly Arg Gly Gln Asp Leu Leu Ser Thr Val Ser Ile Arg Tyr Ser Gly

ES 2 672 320 T3

	625	630	635													
	cac agc ctc tga ggggtgggagg tttgggggacc ttgagagaag agcctgtggg			2035												
	His Ser Leu															
	ctctcctatt ggaatctagt tgggggttgg aggggtaagg aacacagggg gataggggag			2095												
	gggtcttagt tcctttttct gtatcagaag cctgtcttc acaacacagg cacacaattt			2155												
	cagtcccagc caaagcagaa ggggtaatga catggacttg gcgggggggac aagacaaagc			2215												
	tcccgatgct gcatggggcg ctgccagatc tcacggtgaa ccattttggc agaatacagc			2275												
	atggttccca catgcatcta tgcacagaag aaaatctgga aagtgattta tcaggatgtg			2335												
	agcactcgtt gtgtctggat gttacaaata tgggtggttt tattttcttt ttccctgttt			2395												
	agcattttct agttttccac tattattgta tattatctgt ataataaaaa ataattttag			2455												
	ggttggga			2463												
	<210> 2															
	<211> 639															
	<212> PRT															
5	<213> Homo sapiens															
	<400> 2															
	Met	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	His	Pro	
	1			5					10					15		
	His	Pro	Ile	Cys	Glu	Val	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	His	Leu	Glu	Val	Asn
				20					25					30		
	Cys	Asp	Lys	Arg	Asn	Leu	Thr	Ala	Leu	Pro	Pro	Asp	Leu	Pro	Lys	Asp
			35					40					45			
	Thr	Thr	Ile	Leu	His	Leu	Ser	Glu	Asn	Leu	Leu	Tyr	Thr	Phe	Ser	Leu
		50					55					60				
	Ala	Thr	Leu	Met	Pro	Tyr	Thr	Arg	Leu	Thr	Gln	Leu	Asn	Leu	Asp	Arg
	65					70					75					80
	Cys	Glu	Leu	Thr	Lys	Leu	Gln	Val	Asp	Gly	Thr	Leu	Pro	Val	Leu	Gly
					85					90					95	
	Thr	Leu	Asp	Leu	Ser	His	Asn	Gln	Leu	Gln	Ser	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly
				100					105					110		
	Gln	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu	Thr	Val	Leu	Asp	Val	Ser	Phe	Asn	Arg	Leu
			115					120					125			
	Thr	Ser	Leu	Pro	Leu	Gly	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Gly	Glu	Leu	Gln	Glu

ES 2 672 320 T3

130																	
Leu	Tyr	Leu	Lys	Gly	Asn	Glu	Leu	Lys	Thr	Leu	Pro	Pro	Gly	Leu	Leu		
145					150					155					160		
Thr	Pro	Thr	Pro	Lys	Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Leu	Ala	Asn	Asn	Asn	Leu		
				165					170					175			
Thr	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly	Leu	Leu	Asn	Gly	Leu	Glu	Asn	Leu	Asp	Thr		
			180					185					190				
Leu	Leu	Leu	Gln	Glu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Thr	Ile	Pro	Lys	Gly	Phe	Phe		
		195					200					205					
Gly	Ser	His	Leu	Leu	Pro	Phe	Ala	Phe	Leu	His	Gly	Asn	Pro	Trp	Leu		
	210					215					220						
Cys	Asn	Cys	Glu	Ile	Leu	Tyr	Phe	Arg	Arg	Trp	Leu	Gln	Asp	Asn	Ala		
225					230					235					240		
Glu	Asn	Val	Tyr	Val	Trp	Lys	Gln	Gly	Val	Asp	Val	Lys	Ala	Met	Thr		
				245					250					255			
Ser	Asn	Val	Ala	Ser	Val	Gln	Cys	Asp	Asn	Ser	Asp	Lys	Phe	Pro	Val		
			260					265					270				
Tyr	Lys	Tyr	Pro	Gly	Lys	Gly	Cys	Pro	Thr	Leu	Gly	Asp	Glu	Gly	Asp		
		275					280					285					
Thr	Asp	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Glu	Asp	Thr	Glu	Gly	Asp	Lys		
	290					295					300						
Val	Arg	Ala	Thr	Arg	Thr	Val	Val	Lys	Phe	Pro	Thr	Lys	Ala	His	Thr		
305					310					315					320		
Thr	Pro	Trp	Gly	Leu	Phe	Tyr	Ser	Trp	Ser	Thr	Ala	Ser	Leu	Asp	Ser		
				325					330					335			
Gln	Met	Pro	Ser	Ser	Leu	His	Pro	Thr	Gln	Glu	Ser	Thr	Lys	Glu	Gln		
			340					345					350				
Thr	Thr	Phe	Pro	Pro	Arg	Trp	Thr	Pro	Asn	Phe	Thr	Leu	His	Met	Glu		
		355					360					365					
Ser	Ile	Thr	Phe	Ser	Lys	Thr	Pro	Lys	Ser	Thr	Thr	Glu	Pro	Thr	Pro		
	370					375					380						

ES 2 672 320 T3

Ser Pro Thr Thr Ser Glu Pro Val Pro Glu Pro Ala Pro Asn Met Thr
385 390 395 400

Thr Leu Glu Pro Thr Pro Ser Pro Thr Thr Pro Glu Pro Thr Ser Glu
405 410 415

Pro Ala Pro Ser Pro Thr Thr Pro Glu Pro Thr Ser Glu Pro Ala Pro
420 425 430

Ser Pro Thr Thr Pro Glu Pro Thr Pro Ile Pro Thr Ile Ala Thr Ser
435 440 445

Pro Thr Ile Leu Val Ser Ala Thr Ser Leu Ile Thr Pro Lys Ser Thr
450 455 460

Phe Leu Thr Thr Thr Lys Pro Val Ser Leu Leu Glu Ser Thr Lys Lys
465 470 475 480

Thr Ile Pro Glu Leu Asp Gln Pro Pro Lys Leu Arg Gly Val Leu Gln
485 490 495

Gly His Leu Glu Ser Ser Arg Asn Asp Pro Phe Leu His Pro Asp Phe
500 505 510

Cys Cys Leu Leu Pro Leu Gly Phe Tyr Val Leu Gly Leu Phe Trp Leu
515 520 525

Leu Phe Ala Ser Val Val Leu Ile Leu Leu Leu Ser Trp Val Gly His
530 535 540

Val Lys Pro Gln Ala Leu Asp Ser Gly Gln Gly Ala Ala Leu Thr Thr
545 550 555 560

Ala Thr Gln Thr Thr His Leu Glu Leu Gln Arg Gly Arg Gln Val Thr
565 570 575

Val Pro Arg Ala Trp Leu Leu Phe Leu Arg Gly Ser Leu Pro Thr Phe
580 585 590

Arg Ser Ser Leu Phe Leu Trp Val Arg Pro Asn Gly Arg Val Gly Pro
595 600 605

Leu Val Ala Gly Arg Arg Pro Ser Ala Leu Ser Gln Gly Arg Gly Gln
610 615 620

Asp Leu Leu Ser Thr Val Ser Ile Arg Tyr Ser Gly His Ser Leu
625 630 635

ES 2 672 320 T3

<210> 3
 <211> 958
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (28)..(648)
 <400> 3

```

agtaagccgg gctgccgtct tctcgcc atg ggc tcc ggg ccg cgc ggg gcg ctg      54
                Met Gly Ser Gly Pro Arg Gly Ala Leu
                1                               5

agc tta ctg ctc ctg ctg ctg gcc ccg ccg agc cgc ccg gcc gca ggt      102
Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Pro Pro Ser Arg Pro Ala Ala Gly
10                               15                               20                               25

tgc ccg gcg ccc tgt agc tgc gcg ggg acg ctc gtg gac tgc ggg cgc      150
Cys Pro Ala Pro Cys Ser Cys Ala Gly Thr Leu Val Asp Cys Gly Arg
                               30                               35                               40

cgc ggg ctg act tgg gcc tcg ctg ccg acc gcc ttc cct gtc gac aca      198
Arg Gly Leu Thr Trp Ala Ser Leu Pro Thr Ala Phe Pro Val Asp Thr
                               45                               50                               55

acc gag ctg gtg ctg acc ggc aac aac ctg acg gcg ctg ccg ccg ggg      246
Thr Glu Leu Val Leu Thr Gly Asn Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Gly
                               60                               65                               70

ctg ctg gac gcg ctg ccc gcg ctg cgc acc gca cac ctg ggc gcc aac      294
Leu Leu Asp Ala Leu Pro Ala Leu Arg Thr Ala His Leu Gly Ala Asn
75                               80                               85

ccc tgg cgc tgc gac tgc cgc ctt gtg ccg ctg cgc gcc tgg ctg gcc      342
Pro Trp Arg Cys Asp Cys Arg Leu Val Pro Leu Arg Ala Trp Leu Ala
90                               95                               100                               105

ggc cgc ccc gag cgt gcg ccc tac cgc gac ctg cgt tgc gtg gcg ccc      390
Gly Arg Pro Glu Arg Ala Pro Tyr Arg Asp Leu Arg Cys Val Ala Pro
                               110                               115                               120

cca gcg ctg cgc ggc cgc ctg ctg ccc tat ctg gcc gag gac gag ctg      438
Pro Ala Leu Arg Gly Arg Leu Leu Pro Tyr Leu Ala Glu Asp Glu Leu
125                               130                               135

cgc gcc gct tgc gct ccc ggc ccg ctc tgc tgg ggg gcg ctg gcg gcg      486
Arg Ala Ala Cys Ala Pro Gly Pro Leu Cys Trp Gly Ala Leu Ala Ala
140                               145                               150

cag ctt gcg ctg ctg ggc ctt ggg ctg ctg cac gcg ttg ctg ctg gtg      534
Gln Leu Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Leu His Ala Leu Leu Leu Val
155                               160                               165

ctg ctg ctg tgc cgc ctg cgg agg ctg cgg gcc cgg gcc cgc gct cgc      582
Leu Leu Leu Cys Arg Leu Arg Arg Leu Arg Ala Arg Ala Arg Ala Arg
170                               175                               180                               185

gcc gca gcc ccg ctg tcg ctg acc gac ccg ctg gtg gcc gag cga gcc      630
Ala Ala Ala Arg Leu Ser Leu Thr Asp Pro Leu Val Ala Glu Arg Ala
                               190                               195                               200
    
```

ES 2 672 320 T3

gga acc gac gag tcc tga ggagagaacc ggtgcgctct gaggagagaa 678
 Gly Thr Asp Glu Ser
 205

ccggcgctgg gcaacacggg cctgcaaact cgacaggacc ctgcccgagg ggccctcgcg 738

ccaacctgga ccggtccccg cctcctccgc tgcccaatct ctcagacca cccacactgc 798

aggcccagac cacgtgggac agaactcctg cccaccctac cccgagggag gcgaacccgc 858

acttccaggc ttgggaggac catggggcac aatgcggtcc agaccctgct gcgtctcctt 918

tccaaactct ggtgctgaat aaacccttct gatctggtct 958

<210> 4

<211> 206

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Ser Gly Pro Arg Gly Ala Leu Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Ala Pro Pro Ser Arg Pro Ala Ala Gly Cys Pro Ala Pro Cys Ser Cys
 20 25 30

Ala Gly Thr Leu Val Asp Cys Gly Arg Arg Gly Leu Thr Trp Ala Ser
 35 40 45

Leu Pro Thr Ala Phe Pro Val Asp Thr Thr Glu Leu Val Leu Thr Gly
 50 55 60

Asn Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Gly Leu Leu Asp Ala Leu Pro Ala
 65 70 75 80

Leu Arg Thr Ala His Leu Gly Ala Asn Pro Trp Arg Cys Asp Cys Arg
 85 90 95

Leu Val Pro Leu Arg Ala Trp Leu Ala Gly Arg Pro Glu Arg Ala Pro
 100 105 110

Tyr Arg Asp Leu Arg Cys Val Ala Pro Pro Ala Leu Arg Gly Arg Leu
 115 120 125

Leu Pro Tyr Leu Ala Glu Asp Glu Leu Arg Ala Ala Cys Ala Pro Gly
 130 135 140

Pro Leu Cys Trp Gly Ala Leu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Leu Gly Leu
 145 150 155 160

ES 2 672 320 T3

Gly Leu Leu His Ala Leu Leu Leu Val Leu Leu Leu Cys Arg Leu Arg
 165 170 175

Arg Leu Arg Ala Arg Ala Arg Ala Arg Ala Ala Ala Arg Leu Ser Leu
 180 185 190

Thr Asp Pro Leu Val Ala Glu Arg Ala Gly Thr Asp Glu Ser
 195 200 205

- <210> 5
- <211> 3493
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- <222> (32)..(1714)
- <400> 5

5

agttactttg gagtgcagaa ccatttcaga c atg ctg agg ggg act cta ctg 52
 Met Leu Arg Gly Thr Leu Leu
 1 5

tgc gcg gtg ctc ggg ctt ctg cgc gcc cag ccc ttc ccc tgt ccg cca 100
 Cys Ala Val Leu Gly Leu Leu Arg Ala Gln Pro Phe Pro Cys Pro Pro
 10 15 20

gct tgc aag tgt gtc ttc cgg gac gcc gcg cag tgc tcg ggg ggc gac 148
 Ala Cys Lys Cys Val Phe Arg Asp Ala Ala Gln Cys Ser Gly Gly Asp
 25 30 35

gtg gcg cgc atc tcc gcg cta ggc ctg ccc acc aac ctc acg cac atc 196
 Val Ala Arg Ile Ser Ala Leu Gly Leu Pro Thr Asn Leu Thr His Ile
 40 45 50 55

ctg ctc ttc gga atg ggc cgc ggc gtc ctg cag agc cag agc ttc agc 244
 Leu Leu Phe Gly Met Gly Arg Gly Val Leu Gln Ser Gln Ser Phe Ser
 60 65 70

ggc atg acc gtc ctg cag cgc ctc atg atc tcc gac agc cac att tcc 292
 Gly Met Thr Val Leu Gln Arg Leu Met Ile Ser Asp Ser His Ile Ser
 75 80 85

gcc gtt gcc ccc ggc acc ttc agt gac ctg ata aaa ctg aaa acc ctg 340
 Ala Val Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asp Leu Ile Lys Leu Lys Thr Leu
 90 95 100

agg ctg tcg cgc aac aaa atc acg cat ctt cca ggt gcg ctg ctg gat 388
 Arg Leu Ser Arg Asn Lys Ile Thr His Leu Pro Gly Ala Leu Leu Asp
 105 110 115

aag atg gtg ctc ctg gag cag ttg ttt ttg gac cac aat gcg cta agg 436
 Lys Met Val Leu Leu Glu Gln Leu Phe Leu Asp His Asn Ala Leu Arg
 120 125 130 135

ggc att gac caa aac atg ttt cag aaa ctg gtt aac ctg cag gag ctc 484
 Gly Ile Asp Gln Asn Met Phe Gln Lys Leu Val Asn Leu Gln Glu Leu
 140 145 150

10

ES 2 672 320 T3

gct ctg aac cag aat cag ctc gat ttc ctt cct gcc agt ctc ttc acg	532
Ala Leu Asn Gln Asn Gln Leu Asp Phe Leu Pro Ala Ser Leu Phe Thr	
155 160 165	
aat ctg gag aac ctg aag ttg ttg gat tta tcg gga aac aac ctg acc	580
Asn Leu Glu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Leu Ser Gly Asn Asn Leu Thr	
170 175 180	
cac ctg ccc aag ggg ttg ctt gga gca cag gct aag ctc gag aga ctt	628
His Leu Pro Lys Gly Leu Leu Gly Ala Gln Ala Lys Leu Glu Arg Leu	
185 190 195	
ctg ctc cac tcg aac cgc ctt gtg tct ctg gat tcg ggg ctg ttg aac	676
Leu Leu His Ser Asn Arg Leu Val Ser Leu Asp Ser Gly Leu Leu Asn	
200 205 210 215	
agc ctg ggc gcc ctg acg gag ctg cag ttc cac cga aat cac atc cgt	724
Ser Leu Gly Ala Leu Thr Glu Leu Gln Phe His Arg Asn His Ile Arg	
220 225 230	
tcc atc gca ccc ggg gcc ttc gac cgg ctc cca aac ctc agt tct ttg	772
Ser Ile Ala Pro Gly Ala Phe Asp Arg Leu Pro Asn Leu Ser Ser Leu	
235 240 245	
acg ctt tcg aga aac cac ctt gcg ttt ctc ccc tct gcg ctc ttt ctt	820
Thr Leu Ser Arg Asn His Leu Ala Phe Leu Pro Ser Ala Leu Phe Leu	
250 255 260	
cat tcg cac aat ctg act ctg ttg act ctg ttc gag aac ccg ctg gca	868
His Ser His Asn Leu Thr Leu Leu Thr Leu Phe Glu Asn Pro Leu Ala	
265 270 275	
gag ctc ccg ggg gtg ctc ttc ggg gag atg ggg ggc ctg cag gag ctg	916
Glu Leu Pro Gly Val Leu Phe Gly Glu Met Gly Gly Leu Gln Glu Leu	
280 285 290 295	
tgg ctg aac cgc acc cag ctg cgc acc ctg ccc gcc gcc gcc ttc cgc	964
Trp Leu Asn Arg Thr Gln Leu Arg Thr Leu Pro Ala Ala Ala Phe Arg	
300 305 310	
aac ctg agc cgc ctg cgg tac tta ggg gtg act ctg agc ccg cgg ctg	1012
Asn Leu Ser Arg Leu Arg Tyr Leu Gly Val Thr Leu Ser Pro Arg Leu	
315 320 325	
agc gcg ctt ccg cag ggc gcc ttc cag ggc ctt ggc gag ctc cag gtg	1060
Ser Ala Leu Pro Gln Gly Ala Phe Gln Gly Leu Gly Glu Leu Gln Val	
330 335 340	
ctc gcc ctg cac tcc aac ggc ctg acc gcc ctc ccc gac ggc ttg ctg	1108
Leu Ala Leu His Ser Asn Gly Leu Thr Ala Leu Pro Asp Gly Leu Leu	
345 350 355	
cgc ggc ctc ggc aag ctg cgc cag gtg tcc ctg cgc cgc aac agg ctg	1156
Arg Gly Leu Gly Lys Leu Arg Gln Val Ser Leu Arg Arg Asn Arg Leu	
360 365 370 375	
cgc gcc ctg ccc cgt gcc ctc ttc cgc aat ctc agc agc ctg gag agc	1204
Arg Ala Leu Pro Arg Ala Leu Phe Arg Asn Leu Ser Ser Leu Glu Ser	
380 385 390	
gtc cag ctc gac cac aac cag ctg gag acc ctg cct ggc gac gtg ttt	1252
Val Gln Leu Asp His Asn Gln Leu Glu Thr Leu Pro Gly Asp Val Phe	
395 400 405	

ES 2 672 320 T3

ggg gct ctg ccc cgg ctg acg gag gtc ctg ttg ggg cac aac tcc tgg 1300
 Gly Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Val Leu Leu Gly His Asn Ser Trp
 410 415 420

cgc tgc gac tgt ggc ctg ggg ccc ttc ctg ggg tgg ctg cgg cag cac 1348
 Arg Cys Asp Cys Gly Leu Gly Pro Phe Leu Gly Trp Leu Arg Gln His
 425 430 435

cta ggc ctc gtg ggc ggg gaa gag ccc cca cgg tgc gca ggc cct ggg 1396
 Leu Gly Leu Val Gly Gly Glu Pro Pro Arg Cys Ala Gly Pro Gly
 440 445 450 455

gcg cac gcc ggc ctg ccg ctc tgg gcc ctg ccg ggg ggt gac gcg gag 1444
 Ala His Ala Gly Leu Pro Leu Trp Ala Leu Pro Gly Gly Asp Ala Glu
 460 465 470

tgc ccg ggc ccc cgg ggc ccg cct ccc cgc ccc gct gcg gac agc tcc 1492
 Cys Pro Gly Pro Arg Gly Pro Pro Pro Arg Pro Ala Ala Asp Ser Ser
 475 480 485

tcg gaa gcc cct gtc cac cca gcc ttg gct ccc aac agc tca gaa ccc 1540
 Ser Glu Ala Pro Val His Pro Ala Leu Ala Pro Asn Ser Ser Glu Pro
 490 495 500

tgg gtg tgg gcc cag ccg gtg acc acg ggc aaa ggt caa gat cat agt 1588
 Trp Val Trp Ala Gln Pro Val Thr Thr Gly Lys Gly Gln Asp His Ser
 505 510 515

ccg ttc tgg ggg ttt tat ttt ctg ctt tta gct gtt cag gcc atg atc 1636
 Pro Phe Trp Gly Phe Tyr Phe Leu Leu Leu Ala Val Gln Ala Met Ile
 520 525 530 535

acc gtg atc atc gtg ttt gct atg att aaa att ggc caa ctc ttt cga 1684
 Thr Val Ile Ile Val Phe Ala Met Ile Lys Ile Gly Gln Leu Phe Arg
 540 545 550

aaa tta atc aga gag aga gcc ctt ggg taa accaatggga aaatcttcta 1734
 Lys Leu Ile Arg Glu Arg Ala Leu Gly
 555 560

attacttaga acctgaccag atgtggctcg gaggggaatc cagaccctgt gctgtcttgc 1794

tctccctccc ctccccactc ctctctcttt ctctctcttc tctctcactg ccacgccttc 1854

ctttccctcc tctccccct ctccgctctg tgctcttcat tctcacaggc ccgcaacccc 1914

tctctctgt gtccccgcc cgttctctgga aactgagctt gacgtttgta aactgtggtt 1974

gctgccttc ccagctccc acgcggtgt gcgctgacac tgccgggggc gctggactgt 2034

gttggacca tccgtgctcc gctgtgctg gcttgccgtc tgggtgagag aggggcctct 2094

tcagtgtcta ctgagtaagg ggacagctcc aggcgggggc ctgtctctg cacagagtaa 2154

gccggtaaat gtttgtgaaa tcaatgcgtg gataaaggaa cacatgccat ccaagtgatg 2214

atggcttttc ctggagggaa aggataggct gttgctctat ctaatttttt gtttttgttt 2274

ttggacagtc tagctctgtg gcccaggctg gcgtgcagtg ggccgtctca gttcactgca 2334

gcctccgctt ccaggttca agtgattctc atgcctcagc gttctgagta gctgggatta 2394

ES 2 672 320 T3

gaggcgtgtg ccactacacc cggctaattt ttgtactttt taaagtagag acggggcctt 2454
gccatattgg cctggctgat ctcaaaactcc tgggtottgaa ctctggcca caagtgatct 2514
gcccgccttg gcctcccaaa gtgctgggat tacaggcgta agccactaca cctggccctc 2574
ttcatogaat tttatttgag aagtagagct ottggcattt tttcccttgc tccatttttc 2634
tcactttatg tctctctgac ctatgggcta cttgggagag cactggactc cattcatgca 2694
tgagcatttt caggataagc gacttctgtg aggctgagag aggaagaaaa cacggagcct 2754
tccctccagg tgcccagtgt aggtccagcg tgtttcctga gcctcctgtg agtttccact 2814
tgctttacat ccatgcaaca tgtcattttg aaactggatt gatttgcatt tccctggaact 2874
ctgccacctc atttcacaag catttatgga gcagttaaca tgtgactggg attcatgaat 2934
ataatgataa gcttgattct agttcagctg ctgtcacagt ctcaattggt cttccaactg 2994
aaagccgtaa aacctttggt gctttaattg aatgtctgtg cttatgagag gcagtgggta 3054
aaacaggggc tggcgagttg acaactgtgg gttcaaatcc cagctctacc acttactaac 3114
tgcatgggac tttgggtaag acacctgctt acattctcta agccttggtt tccctgaacct 3174
taaaacagga taacatagta cctgcttctg agagtttttg tgagaattaa aggcaataaa 3234
gcatataatg acttagccca ggggcctgca ggcaatacat gttaatgaat gttagctatt 3294
attactaaag gatgagcaat tattattggc atcatgattt ctaaagaaga gctttgagtt 3354
ggtatTTTTT tctgtgtata agggtaagtc cgaactttct cagactggag gttacattca 3414
catcagtctg tcttccctg cggatggcct cagccctggg tggccagact ctgtgctcac 3474
aatccagagc aatggatcc 3493

<210> 6
<211> 560
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Leu Arg Gly Thr Leu Leu Cys Ala Val Leu Gly Leu Leu Arg Ala
1 5 10 15

Gln Pro Phe Pro Cys Pro Pro Ala Cys Lys Cys Val Phe Arg Asp Ala
20 25 30

Ala Gln Cys Ser Gly Gly Asp Val Ala Arg Ile Ser Ala Leu Gly Leu
35 40 45

Pro Thr Asn Leu Thr His Ile Leu Leu Phe Gly Met Gly Arg Gly Val
50 55 60

Leu Gln Ser Gln Ser Phe Ser Gly Met Thr Val Leu Gln Arg Leu Met

ES 2 672 320 T3

65 70 75 80

Ile Ser Asp Ser His Ile Ser Ala Val Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asp
 85 90 95

Leu Ile Lys Leu Lys Thr Leu Arg Leu Ser Arg Asn Lys Ile Thr His
 100 105 110

Leu Pro Gly Ala Leu Leu Asp Lys Met Val Leu Leu Glu Gln Leu Phe
 115 120 125

Leu Asp His Asn Ala Leu Arg Gly Ile Asp Gln Asn Met Phe Gln Lys
 130 135 140

Leu Val Asn Leu Gln Glu Leu Ala Leu Asn Gln Asn Gln Leu Asp Phe
145 150 155 160

Leu Pro Ala Ser Leu Phe Thr Asn Leu Glu Asn Leu Lys Leu Leu Asp
 165 170 175

Leu Ser Gly Asn Asn Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Leu Leu Gly Ala
 180 185 190

Gln Ala Lys Leu Glu Arg Leu Leu Leu His Ser Asn Arg Leu Val Ser
 195 200 205

Leu Asp Ser Gly Leu Leu Asn Ser Leu Gly Ala Leu Thr Glu Leu Gln
210 215 220

Phe His Arg Asn His Ile Arg Ser Ile Ala Pro Gly Ala Phe Asp Arg
225 230 235 240

Leu Pro Asn Leu Ser Ser Leu Thr Leu Ser Arg Asn His Leu Ala Phe
 245 250 255

Leu Pro Ser Ala Leu Phe Leu His Ser His Asn Leu Thr Leu Leu Thr
 260 265 270

Leu Phe Glu Asn Pro Leu Ala Glu Leu Pro Gly Val Leu Phe Gly Glu
 275 280 285

Met Gly Gly Leu Gln Glu Leu Trp Leu Asn Arg Thr Gln Leu Arg Thr
290 295 300

Leu Pro Ala Ala Ala Phe Arg Asn Leu Ser Arg Leu Arg Tyr Leu Gly
305 310 315 320

ES 2 672 320 T3

Val Thr Leu Ser Pro Arg Leu Ser Ala Leu Pro Gln Gly Ala Phe Gln
 325 330 335

Gly Leu Gly Glu Leu Gln Val Leu Ala Leu His Ser Asn Gly Leu Thr
 340 345 350

Ala Leu Pro Asp Gly Leu Leu Arg Gly Leu Gly Lys Leu Arg Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Arg Arg Asn Arg Leu Arg Ala Leu Pro Arg Ala Leu Phe Arg
 370 375 380

Asn Leu Ser Ser Leu Glu Ser Val Gln Leu Asp His Asn Gln Leu Glu
 385 390 395 400

Thr Leu Pro Gly Asp Val Phe Gly Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Val
 405 410 415

Leu Leu Gly His Asn Ser Trp Arg Cys Asp Cys Gly Leu Gly Pro Phe
 420 425 430

Leu Gly Trp Leu Arg Gln His Leu Gly Leu Val Gly Gly Glu Glu Pro
 435 440 445

Pro Arg Cys Ala Gly Pro Gly Ala His Ala Gly Leu Pro Leu Trp Ala
 450 455 460

Leu Pro Gly Gly Asp Ala Glu Cys Pro Gly Pro Arg Gly Pro Pro Pro
 465 470 475 480

Arg Pro Ala Ala Asp Ser Ser Ser Glu Ala Pro Val His Pro Ala Leu
 485 490 495

Ala Pro Asn Ser Ser Glu Pro Trp Val Trp Ala Gln Pro Val Thr Thr
 500 505 510

Gly Lys Gly Gln Asp His Ser Pro Phe Trp Gly Phe Tyr Phe Leu Leu
 515 520 525

Leu Ala Val Gln Ala Met Ile Thr Val Ile Ile Val Phe Ala Met Ile
 530 535 540

Lys Ile Gly Gln Leu Phe Arg Lys Leu Ile Arg Glu Arg Ala Leu Gly
 545 550 555 560

<210> 7
 <211> 900
 <212> ADN

ES 2 672 320 T3

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (188)..(721)

5 <400> 7

```

gccaggacct ttcaggccag acaggagcac ctgaccaaag gcttcacagc cgcctcacc      60
gcccggcctt ctacgggtgtc cagagacagt tagccaggcc tgggctgggc aactccacc      120
ttccctagtc accagctggt ttcccagagg agaaggctga gacccgagaa gggagccagc      180
ctgtccc atg cct gcc tgg gga gcc ctg ttc ctg ctc tgg gcc aca gca      229
      Met Pro Ala Trp Gly Ala Leu Phe Leu Leu Trp Ala Thr Ala
      1                    5                            10
gag gcc acc aag gac tgc ccc agc cca tgt acc tgc cgc gcc ctg gaa      277
Glu Ala Thr Lys Asp Cys Pro Ser Pro Cys Thr Cys Arg Ala Leu Glu
15                    20                            25                            30
acc atg ggg ctg tgg gtg gac tgc agg ggc cac gga ctc acg gcc ctg      325
Thr Met Gly Leu Trp Val Asp Cys Arg Gly His Gly Leu Thr Ala Leu
      35                    40                            45
cct gcc ctg ccg gcc cgc acc cgc cac ctt ctg ctg gcc aac aac agc      373
Pro Ala Leu Pro Ala Arg Thr Arg His Leu Leu Leu Ala Asn Asn Ser
      50                    55                            60
ctt cag tcc gtg ccc ccg gga gcc ttt gac cac ctg ccc cag ctg cag      421
Leu Gln Ser Val Pro Pro Gly Ala Phe Asp His Leu Pro Gln Leu Gln
      65                    70                            75
acc ctc gat gtg acg cag aac ccc tgg cac tgt gac tgc agc ctc acc      469
Thr Leu Asp Val Thr Gln Asn Pro Trp His Cys Asp Cys Ser Leu Thr
      80                    85                            90
tat ctg cgc ctc tgg ctg gag gac cgc acg ccc gag gcc ctg ctg cag      517
Tyr Leu Arg Leu Trp Leu Glu Asp Arg Thr Pro Glu Ala Leu Leu Gln
      95                    100                            105                            110
gtc cgc tgt gcc agc ccc agc ctc gct gcc cat ggc ccg ctg ggc cgg      565
Val Arg Cys Ala Ser Pro Ser Leu Ala Ala His Gly Pro Leu Gly Arg
      115                    120                            125
ctg aca ggc tac cag ctg ggc agc tgt ggc tgg cag ctg cag gcg tcc      613
Leu Thr Gly Tyr Gln Leu Gly Ser Cys Gly Trp Gln Leu Gln Ala Ser
      130                    135                            140
tgg gtg cgc ccg ggg gtc ttg tgg gac gtg gcg ctg gtc gcc gtg gcc      661
Trp Val Arg Pro Gly Val Leu Trp Asp Val Ala Leu Val Ala Val Ala
      145                    150                            155
gcg ctg ggc ctg gct ctt ctg gct ggc ctg ctg tgt gcc acc aca gag      709
Ala Leu Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Leu Cys Ala Thr Thr Glu
      160                    165                            170
gcc ctg gat tga gccaggcccc cagaaccctt ggctccaggc cagggggcca      761
Ala Leu Asp
175
gtccctgagg caggtcccca gactccacca agcctggtca gcccaaacca ccagaagccc      821

```

ES 2 672 320 T3

agaataaact ggcagctcag ctgttttata taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 881

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 900

<210> 8
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 8

Met Pro Ala Trp Gly Ala Leu Phe Leu Leu Trp Ala Thr Ala Glu Ala
 1 5 10 15

Thr Lys Asp Cys Pro Ser Pro Cys Thr Cys Arg Ala Leu Glu Thr Met
 20 25 30

Gly Leu Trp Val Asp Cys Arg Gly His Gly Leu Thr Ala Leu Pro Ala
 35 40 45

Leu Pro Ala Arg Thr Arg His Leu Leu Leu Ala Asn Asn Ser Leu Gln
 50 55 60

Ser Val Pro Pro Gly Ala Phe Asp His Leu Pro Gln Leu Gln Thr Leu
 65 70 75 80

Asp Val Thr Gln Asn Pro Trp His Cys Asp Cys Ser Leu Thr Tyr Leu
 85 90 95

Arg Leu Trp Leu Glu Asp Arg Thr Pro Glu Ala Leu Leu Gln Val Arg
 100 105 110

Cys Ala Ser Pro Ser Leu Ala Ala His Gly Pro Leu Gly Arg Leu Thr
 115 120 125

Gly Tyr Gln Leu Gly Ser Cys Gly Trp Gln Leu Gln Ala Ser Trp Val
 130 135 140

Arg Pro Gly Val Leu Trp Asp Val Ala Leu Val Ala Val Ala Ala Leu
 145 150 155 160

Gly Leu Ala Leu Leu Ala Gly Leu Leu Cys Ala Thr Thr Glu Ala Leu
 165 170 175

Asp

<210> 9
 <211> 8833
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> CDS

ES 2 672 320 T3

<222> (251)..(8692)

<400> 9

agctcacagc tattgtggtg ggaaagggag ggtgggttgg	ggatgtcaca gcttgggctt	60
tatctcccc agcagtgggg actccacagc ccctgggcta	cataacagca agacagtccg	120
gagctgtagc agacctgatt gagcctttgc agcagctgag	agcatggcct aggggtgggag	180
gcaccattgt ccagcagctg agtttcccag ggaccttgga	gatagccgca gccctcattt	240
gcaggggaag atg att cct gcc aga ttt gcc ggg	gtg ctg ctt gct ctg	289
Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu		
1 5 10		
gcc ctc att ttg cca ggg acc ctt tgt gca gaa gga	act cgc ggc agg	337
Ala Leu Ile Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg		
15 20 25		
tca tcc acg gcc cga tgc agc ctt ttc gga agt gac	ttc gtc aac acc	385
Ser Ser Thr Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr		
30 35 40 45		
ttt gat ggg agc atg tac agc ttt gcg gga tac tgc	agt tac ctc ctg	433
Phe Asp Gly Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu		
50 55 60		
gca ggg ggc tgc cag aaa cgc tcc ttc tcg att att	ggg gac ttc cag	481
Ala Gly Gly Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln		
65 70 75		
aat ggc aag aga gtg agc ctc tcc gtg tat ctt ggg	gaa ttt ttt gac	529
Asn Gly Lys Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp		
80 85 90		
atc cat ttg ttt gtc aat ggt acc gtg aca cag ggg	gac caa aga gtc	577
Ile His Leu Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val		
95 100 105		
tcc atg ccc tat gcc tcc aaa ggg ctg tat cta gaa	act gag gct ggg	625
Ser Met Pro Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly		
110 115 120 125		
tac tac aag ctg tcc ggt gag gcc tat ggc ttt gtg	gcc agg atc gat	673
Tyr Tyr Lys Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp		
130 135 140		
ggc agc ggc aac ttt caa gtc ctg ctg tca gac aga	tac ttc aac aag	721
Gly Ser Gly Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys		
145 150 155		
acc tgc ggg ctg tgt ggc aac ttt aac atc ttt gct	gaa gat gac ttt	769
Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe		
160 165 170		
atg acc caa gaa ggg acc ttg acc tcg gac cct tat	gac ttt gcc aac	817
Met Thr Gln Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn		

ES 2 672 320 T3

175		180		185														
tca tgg gct ctg agc agt gga gaa cag tgg tgt gaa cgg gca tct cct																		865
Ser Trp Ala Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro																		205
190		195		200														
ccc agc agc tca tgc aac atc tcc tct ggg gaa atg cag aag ggc ctg																		913
Pro Ser Ser Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu																		220
210		215		220														
tgg gag cag tgc cag ctt ctg aag agc acc tcg gtg ttt gcc cgc tgc																		961
Trp Glu Gln Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys																		235
225		230		235														
cac cct ctg gtg gac ccc gag cct ttt gtg gcc ctg tgt gag aag act																		1009
His Pro Leu Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr																		250
240		245		250														
ttg tgt gag tgt gct ggg ggg ctg gag tgc gcc tgc cct gcc ctg ctg																		1057
Leu Cys Glu Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu																		265
255		260		265														
gag tac gcc cgg acc tgt gcc cag gag gga atg gtg ctg tac ggc tgg																		1105
Glu Tyr Ala Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp																		285
270		275		280														
acc gac cac agc gcg tgc agc cca gtg tgc cct gct ggt atg gag tat																		1153
Thr Asp His Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr																		300
290		295		300														
agg cag tgt gtg tcc cct tgc gcc agg acc tgc cag agc ctg cac atc																		1201
Arg Gln Cys Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile																		315
305		310		315														
aat gaa atg tgt cag gag cga tgc gtg gat ggc tgc agc tgc cct gag																		1249
Asn Glu Met Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu																		330
320		325		330														
gga cag ctg ctg gat gaa ggc ctg tgc gtg gag agc acc gag tgt ccc																		1297
Gly Gln Leu Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro																		345
335		340		345														
tgc gtg cat tcc gga aag cgc tac cct ccc ggc acc tcc ctg tct cga																		1345
Cys Val His Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg																		365
350		355		360														
gac tgc aac acc tgc att tgc cga aac agc cag tgg atc tgc agc aat																		1393
Asp Cys Asn Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn																		380
370		375		380														
gaa gaa tgt cca ggg gag tgc ctt gtc aca ggt caa tca cac ttc aag																		1441
Glu Glu Cys Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys																		395
385		390		395														
agc ttt gac aac aga tac ttc acc ttc agt ggg atc tgc cag tac ctg																		1489
Ser Phe Asp Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu																		410
400		405		410														
ctg gcc cgg gat tgc cag gac cac tcc ttc tcc att gtc att gag act																		1537
Leu Ala Arg Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr																		425
415		420		425														
gtc cag tgt gct gat gac cgc gac gct gtg tgc acc cgc tcc gtc acc																		1585

ES 2 672 320 T3

Val	Gln	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Asp	Ala	Val	Cys	Thr	Arg	Ser	Val	Thr		
430					435					440					445		
gtc	cgg	ctg	cct	ggc	ctg	cac	aac	agc	ctt	gtg	aaa	ctg	aag	cat	ggg	1633	
Val	Arg	Leu	Pro	Gly	Leu	His	Asn	Ser	Leu	Val	Lys	Leu	Lys	His	Gly		
				450					455					460			
gca	gga	ggt	gcc	atg	gat	ggc	cag	gac	gtc	cag	ctc	ccc	ctc	ctg	aaa	1681	
Ala	Gly	Val	Ala	Met	Asp	Gly	Gln	Asp	Val	Gln	Leu	Pro	Leu	Leu	Lys		
			465					470					475				
ggt	gac	ctc	cgc	atc	cag	cat	aca	gtg	acg	gcc	tcc	gtg	cgc	ctc	agc	1729	
Gly	Asp	Leu	Arg	Ile	Gln	His	Thr	Val	Thr	Ala	Ser	Val	Arg	Leu	Ser		
		480				485						490					
tac	ggg	gag	gac	ctg	cag	atg	gac	tgg	gat	ggc	cgc	ggg	agg	ctg	ctg	1777	
Tyr	Gly	Glu	Asp	Leu	Gln	Met	Asp	Trp	Asp	Gly	Arg	Gly	Arg	Leu	Leu		
	495					500				505							
gtg	aag	ctg	tcc	ccc	gtc	tat	gcc	ggg	aag	acc	tgc	ggc	ctg	tgt	ggg	1825	
Val	Lys	Leu	Ser	Pro	Val	Tyr	Ala	Gly	Lys	Thr	Cys	Gly	Leu	Cys	Gly		
510					515					520					525		
aat	tac	aat	ggc	aac	cag	ggc	gac	gac	ttc	ctt	acc	ccc	tct	ggg	ctg	1873	
Asn	Tyr	Asn	Gly	Asn	Gln	Gly	Asp	Asp	Phe	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	Leu		
			530					535						540			
gcg	gag	ccc	cgg	gtg	gag	gac	ttc	ggg	aac	gcc	tgg	aag	ctg	cac	ggg	1921	
Ala	Glu	Pro	Arg	Val	Glu	Asp	Phe	Gly	Asn	Ala	Trp	Lys	Leu	His	Gly		
			545					550					555				
gac	tgc	cag	gac	ctg	cag	aag	cag	cac	agc	gat	ccc	tgc	gcc	ctc	aac	1969	
Asp	Cys	Gln	Asp	Leu	Gln	Lys	Gln	His	Ser	Asp	Pro	Cys	Ala	Leu	Asn		
		560					565					570					
ccg	cgc	atg	acc	agg	ttc	tcc	gag	gag	gcg	tgc	gcg	gtc	ctg	acg	tcc	2017	
Pro	Arg	Met	Thr	Arg	Phe	Ser	Glu	Glu	Ala	Cys	Ala	Val	Leu	Thr	Ser		
		575				580						585					
ccc	aca	ttc	gag	gcc	tgc	cat	cgt	gcc	gtc	agc	ccg	ctg	ccc	tac	ctg	2065	
Pro	Thr	Phe	Glu	Ala	Cys	His	Arg	Ala	Val	Ser	Pro	Leu	Pro	Tyr	Leu		
590					595					600					605		
cgg	aac	tgc	cgc	tac	gac	gtg	tgc	tcc	tgc	tcg	gac	ggc	cgc	gag	tgc	2113	
Arg	Asn	Cys	Arg	Tyr	Asp	Val	Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Gly	Arg	Glu	Cys		
				610					615					620			
ctg	tgc	ggc	gcc	ctg	gcc	agc	tat	gcc	gcg	gcc	tgc	gcg	ggg	aga	ggc	2161	
Leu	Cys	Gly	Ala	Leu	Ala	Ser	Tyr	Ala	Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Arg	Gly		
			625					630					635				
gtg	cgc	gtc	gcg	tgg	cgc	gag	cca	ggc	cgc	tgt	gag	ctg	aac	tgc	ccg	2209	
Val	Arg	Val	Ala	Trp	Arg	Glu	Pro	Gly	Arg	Cys	Glu	Leu	Asn	Cys	Pro		
		640					645					650					
aaa	ggc	cag	gtg	tac	ctg	cag	tgc	ggg	acc	ccc	tgc	aac	ctg	acc	tgc	2257	
Lys	Gly	Gln	Val	Tyr	Leu	Gln	Cys	Gly	Thr	Pro	Cys	Asn	Leu	Thr	Cys		
	655					660					665						
cgc	tct	ctc	tct	tac	ccg	gat	gag	gaa	tgc	aat	gag	gcc	tgc	ctg	gag	2305	
Arg	Ser	Leu	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Glu	Cys	Asn	Glu	Ala	Cys	Leu	Glu		
670					675					680					685		

ES 2 672 320 T3

ggc tgc ttc tgc ccc cca ggg ctc tac atg gat gag agg ggg gac tgc 2353
 Gly Cys Phe Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys
 690 695 700

gtg ccc aag gcc cag tgc ccc tgt tac tat gac ggt gag atc ttc cag 2401
 Val Pro Lys Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln
 705 710 715

cca gaa gac atc ttc tca gac cat cac acc atg tgc tac tgt gag gat 2449
 Pro Glu Asp Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp
 720 725 730

ggc ttc atg cac tgt acc atg agt gga gtc ccc gga agc ttg ctg cct 2497
 Gly Phe Met His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro
 735 740 745

gac gct gtc ctc agc agt ccc ctg tct cat cgc agc aaa agg agc cta 2545
 Asp Ala Val Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu
 750 755 760 765

tcc tgt cgg ccc ccc atg gtc aag ctg gtg tgt ccc gct gac aac ctg 2593
 Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu
 770 775 780

cgg gct gaa ggg ctc gag tgt acc aaa acg tgc cag aac tat gac ctg 2641
 Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu
 785 790 795

gag tgc atg agc atg ggc tgt gtc tct ggc tgc ctc tgc ccc ccg ggc 2689
 Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly
 800 805 810

atg gtc cgg cat gag aac aga tgt gtg gcc ctg gaa agg tgt ccc tgc 2737
 Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys
 815 820 825

ttc cat cag ggc aag gag tat gcc cct gga gaa aca gtg aag att ggc 2785
 Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly
 830 835 840 845

tgc aac act tgt gtc tgt cgg gac cgg aag tgg aac tgc aca gac cat 2833
 Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His
 850 855 860

gtg tgt gat gcc acg tgc tcc acg atc ggc atg gcc cac tac ctc acc 2881
 Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr
 865 870 875

ttc gac ggg ctc aaa tac ctg ttc ccc ggg gag tgc cag tac gtt ctg 2929
 Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu
 880 885 890

gtg cag gat tac tgc ggc agt aac cct ggg acc ttt cgg atc cta gtg 2977
 Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val
 895 900 905

ggg aat aag gga tgc agc cac ccc tca gtg aaa tgc aag aaa cgg gtc 3025
 Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val
 910 915 920 925

acc atc ctg gtg gag gga gga gag att gag ctg ttt gac ggg gag gtg 3073
 Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val
 930 935 940

ES 2 672 320 T3

aat gtg aag agg ccc atg aag gat gag act cac ttt gag gtg gtg gag	3121
Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu	
945 950 955	
tct ggc cgg tac atc att ctg ctg ctg ggc aaa gcc ctc tcc gtg gtc	3169
Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val	
960 965 970	
tgg gac cgc cac ctg agc atc tcc gtg gtc ctg aag cag aca tac cag	3217
Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln	
975 980 985	
gag aaa gtg tgt ggc ctg tgt ggg aat ttt gat ggc atc cag aac aat	3265
Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn	
990 995 1000 1005	
gac ctc acc agc agc aac ctc caa gtg gag gaa gac cct gtg gac	3310
Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp	
1010 1015 1020	
ttt ggg aac tcc tgg aaa gtg agc tgg cag tgt gct gac acc aga	3355
Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg	
1025 1030 1035	
aaa gtg cct ctg gac tca tcc cct gcc acc tgc cat aac aac atc	3400
Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile	
1040 1045 1050	
atg aag cag acg atg gtg gat tcc tcc tgt aga atc ctt acc agt	3445
Met Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser	
1055 1060 1065	
gac gtc ttc cag gac tgc aac aag ctg gtg gac ccc gag cca tat	3490
Asp Val Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr	
1070 1075 1080	
ctg gat gtc tgc att tac gac acc tgc tcc tgt gag tcc att ggg	3535
Leu Asp Val Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly	
1085 1090 1095	
gac tgc gcc tgc ttc tgc gac acc att gct gcc tat gcc cac gtg	3580
Asp Cys Ala Cys Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val	
1100 1105 1110	
tgt gcc cag cat ggc aag gtg gtg acc tgg agg acg gcc aca ttg	3625
Cys Ala Gln His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu	
1115 1120 1125	
tgc ccc cag agc tgc gag gag agg aat ctc cgg gag aac ggg tat	3670
Cys Pro Gln Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr	
1130 1135 1140	
gag tgt gag tgg cgc tat aac agc tgt gca cct gcc tgt caa gtc	3715
Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val	
1145 1150 1155	
acg tgt cag cac cct gag cca ctg gcc tgc cct gtg cag tgt gtg	3760
Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val	
1160 1165 1170	
gag ggc tgc cat gcc cac tgc cct cca ggg aaa atc ctg gat gag	3805
Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu	

ES 2 672 320 T3

	1175		1180		1185	
ctt ttg cag acc tgc gtt gac cct gaa gac tgt cca gtg tgt gag						3850
Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu						
	1190		1195		1200	
gtg gct ggc cgg cgt ttt gcc tca gga aag aaa gtc acc ttg aat						3895
Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn						
	1205		1210		1215	
ccc agt gac cct gag cac tgc cag att tgc cac tgt gat gtt gtc						3940
Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val						
	1220		1225		1230	
aac ctc acc tgt gaa gcc tgc cag gag ccg gga ggc ctg gtg gtg						3985
Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val						
	1235		1240		1245	
cct ccc aca gat gcc ccg gtg agc ccc acc act ctg tat gtg gag						4030
Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu						
	1250		1255		1260	
gac atc tcg gaa ccg ccg ttg cac gat ttc tac tgc agc agg cta						4075
Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu						
	1265		1270		1275	
ctg gac ctg gtc ttc ctg ctg gat ggc tcc tcc agg ctg tcc gag						4120
Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu						
	1280		1285		1290	
gct gag ttt gaa gtg ctg aag gcc ttt gtg gtg gac atg atg gag						4165
Ala Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu						
	1295		1300		1305	
cgg ctg cgc atc tcc cag aag tgg gtc cgc gtg gcc gtg gtg gag						4210
Arg Leu Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu						
	1310		1315		1320	
tac cac gac ggc tcc cac gcc tac atc ggg ctc aag gac cgg aag						4255
Tyr His Asp Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys						
	1325		1330		1335	
cga ccg tca gag ctg cgg cgc att gcc agc cag gtg aag tat gcg						4300
Arg Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala						
	1340		1345		1350	
ggc agc cag gtg gcc tcc acc agc gag gtc ttg aaa tac aca ctg						4345
Gly Ser Gln Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu						
	1355		1360		1365	
ttc caa atc ttc agc aag atc gac cgc cct gaa gcc tcc cgc atc						4390
Phe Gln Ile Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile						
	1370		1375		1380	
acc ctg ctc ctg atg gcc agc cag gag ccc caa cgg atg tcc cgg						4435
Thr Leu Leu Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg						
	1385		1390		1395	
aac ttt gtc cgc tac gtc cag ggc ctg aag aag aag aag gtc att						4480
Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile						
	1400		1405		1410	
gtg atc ccg gtg ggc att ggg ccc cat gcc aac ctc aag cag atc						4525

ES 2 672 320 T3

Val	Ile	Pro	Val	Gly	Ile	Gly	Pro	His	Ala	Asn	Leu	Lys	Gln	Ile			
				1415					1420					1425			
cgc	ctc	atc	gag	aag	cag	gcc	cct	gag	aac	aag	gcc	ttc	gtg	ctg			4570
Arg	Leu	Ile	Glu	Lys	Gln	Ala	Pro	Glu	Asn	Lys	Ala	Phe	Val	Leu			1440
				1430					1435					1440			
agc	agt	gtg	gat	gag	ctg	gag	cag	caa	agg	gac	gag	atc	gtt	agc			4615
Ser	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Glu	Gln	Gln	Arg	Asp	Glu	Ile	Val	Ser			1455
				1445					1450					1455			
tac	ctc	tgt	gac	ctt	gcc	cct	gaa	gcc	cct	cct	cct	act	ctg	ccc			4660
Tyr	Leu	Cys	Asp	Leu	Ala	Pro	Glu	Ala	Pro	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro			1470
				1460					1465					1470			
ccc	gac	atg	gca	caa	gtc	act	gtg	ggc	ccg	ggg	ctc	ttg	ggg	gtt			4705
Pro	Asp	Met	Ala	Gln	Val	Thr	Val	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Val			1485
				1475					1480					1485			
tcg	acc	ctg	ggg	ccc	aag	agg	aac	tcc	atg	gtt	ctg	gat	gtg	gcg			4750
Ser	Thr	Leu	Gly	Pro	Lys	Arg	Asn	Ser	Met	Val	Leu	Asp	Val	Ala			1500
				1490					1495					1500			
ttc	gtc	ctg	gaa	gga	tcg	gac	aaa	att	ggt	gaa	gcc	gac	ttc	aac			4795
Phe	Val	Leu	Glu	Gly	Ser	Asp	Lys	Ile	Gly	Glu	Ala	Asp	Phe	Asn			1515
				1505					1510					1515			
agg	agc	aag	gag	ttc	atg	gag	gag	gtg	att	cag	cgg	atg	gat	gtg			4840
Arg	Ser	Lys	Glu	Phe	Met	Glu	Glu	Val	Ile	Gln	Arg	Met	Asp	Val			1530
				1520					1525					1530			
ggc	cag	gac	agc	atc	cac	gtc	acg	gtg	ctg	cag	tac	tcc	tac	atg			4885
Gly	Gln	Asp	Ser	Ile	His	Val	Thr	Val	Leu	Gln	Tyr	Ser	Tyr	Met			1545
				1535					1540					1545			
gtg	act	gtg	gag	tac	ccc	ttc	agc	gag	gca	cag	tcc	aaa	ggg	gac			4930
Val	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Phe	Ser	Glu	Ala	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp			1560
				1550					1555					1560			
atc	ctg	cag	cgg	gtg	cga	gag	atc	cgc	tac	cag	ggc	ggc	aac	agg			4975
Ile	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Glu	Ile	Arg	Tyr	Gln	Gly	Gly	Asn	Arg			1575
				1565					1570					1575			
acc	aac	act	ggg	ctg	gcc	ctg	cgg	tac	ctc	tct	gac	cac	agc	ttc			5020
Thr	Asn	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Arg	Tyr	Leu	Ser	Asp	His	Ser	Phe			1590
				1580					1585					1590			
ttg	gtc	agc	cag	ggt	gac	cgg	gag	cag	gcg	ccc	aac	ctg	gtc	tac			5065
Leu	Val	Ser	Gln	Gly	Asp	Arg	Glu	Gln	Ala	Pro	Asn	Leu	Val	Tyr			1605
				1595					1600					1605			
atg	gtc	acc	gga	aat	cct	gcc	tct	gat	gag	atc	aag	agg	ctg	cct			5110
Met	Val	Thr	Gly	Asn	Pro	Ala	Ser	Asp	Glu	Ile	Lys	Arg	Leu	Pro			1620
				1610					1615					1620			
gga	gac	atc	cag	gtg	gtg	ccc	att	gga	gtg	ggc	cct	aat	gcc	aac			5155
Gly	Asp	Ile	Gln	Val	Val	Pro	Ile	Gly	Val	Gly	Pro	Asn	Ala	Asn			1635
				1625					1630					1635			
gtg	cag	gag	ctg	gag	agg	att	ggc	tgg	ccc	aat	gcc	cct	atc	ctc			5200
Val	Gln	Glu	Leu	Glu	Arg	Ile	Gly	Trp	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu			1650
				1640					1645					1650			

ES 2 672 320 T3

atc cag gac ttt gag acg ctc ccc cga gag gct cct gac ctg gtg	5245
Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val	
1655 1660 1665	
ctg cag agg tgc tgc tcc gga gag ggg ctg cag atc ccc acc ctc	5290
Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu	
1670 1675 1680	
tcc cct gca cct gac tgc agc cag ccc ctg gac gtg atc ctt ctc	5335
Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu	
1685 1690 1695	
ctg gat ggc tcc tcc agt ttc cca gct tct tat ttt gat gaa atg	5380
Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met	
1700 1705 1710	
aag agt ttc gcc aag gct ttc att tca aaa gcc aat ata ggg cct	5425
Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro	
1715 1720 1725	
cgt ctc act cag gtg tca gtg ctg cag tat gga agc atc acc acc	5470
Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr	
1730 1735 1740	
att gac gtg cca tgg aac gtg gtc ccg gag aaa gcc cat ttg ctg	5515
Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu	
1745 1750 1755	
agc ctt gtg gac gtc atg cag cgg gag gga ggc ccc agc caa atc	5560
Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile	
1760 1765 1770	
ggg gat gcc ttg ggc ttt gct gtg cga tac ttg act tca gaa atg	5605
Gly Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met	
1775 1780 1785	
cat ggt gcc agg ccg gga gcc tca aag gcg gtg gtc atc ctg gtc	5650
His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val	
1790 1795 1800	
acg gac gtc tct gtg gat tca gtg gat gca gca gct gat gcc gcc	5695
Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala	
1805 1810 1815	
agg tcc aac aga gtg aca gtg ttc cct att gga att gga gat cgc	5740
Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg	
1820 1825 1830	
tac gat gca gcc cag cta cgg atc ttg gca ggc cca gca ggc gac	5785
Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp	
1835 1840 1845	
tcc aac gtg gtg aag ctc cag cga atc gaa gac ctc cct acc atg	5830
Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met	
1850 1855 1860	
gtc acc ttg ggc aat tcc ttc ctc cac aaa ctg tgc tct gga ttt	5875
Val Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe	
1865 1870 1875	
gtt agg att tgc atg gat gag gat ggg aat gag aag agg ccc ggg	5920
Val Arg Ile Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly	
1880 1885 1890	

ES 2 672 320 T3

gac gtc tgg acc ttg cca gac cag tgc cac acc gtg act tgc cag	5965
Asp Val Trp Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln	
1895 1900 1905	
cca gat ggc cag acc ttg ctg aag agt cat cgg gtc aac tgt gac	6010
Pro Asp Gly Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp	
1910 1915 1920	
cgg ggg ctg agg cct tcg tgc cct aac agc cag tcc cct gtt aaa	6055
Arg Gly Leu Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys	
1925 1930 1935	
gtg gaa gag acc tgt ggc tgc cgc tgg acc tgc ccc tgc gtg tgc	6100
Val Glu Glu Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys	
1940 1945 1950	
aca ggc agc tcc act cgg cac atc gtg acc ttt gat ggg cag aat	6145
Thr Gly Ser Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn	
1955 1960 1965	
ttc aag ctg act ggc agc tgt tct tat gtc cta ttt caa aac aag	6190
Phe Lys Leu Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys	
1970 1975 1980	
gag cag gac ctg gag gtg att ctc cat aat ggt gcc tgc agc cct	6235
Glu Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro	
1985 1990 1995	
gga gca agg cag ggc tgc atg aaa tcc atc gag gtg aag cac agt	6280
Gly Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser	
2000 2005 2010	
gcc ctc tcc gtc gag ctg cac agt gac atg gag gtg acg gtg aat	6325
Ala Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn	
2015 2020 2025	
ggg aga ctg gtc tct gtt cct tac gtg ggt ggg aac atg gaa gtc	6370
Gly Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val	
2030 2035 2040	
aac gtt tat ggt gcc atc atg cat gag gtc aga ttc aat cac ctt	6415
Asn Val Tyr Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu	
2045 2050 2055	
ggt cac atc ttc aca ttc act cca caa aac aat gag ttc caa ctg	6460
Gly His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu	
2060 2065 2070	
cag ctc agc ccc aag act ttt gct tca aag acg tat ggt ctg tgt	6505
Gln Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys	
2075 2080 2085	
ggg atc tgt gat gag aac gga gcc aat gac ttc atg ctg agg gat	6550
Gly Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp	
2090 2095 2100	
ggc aca gtc acc aca gac tgg aaa aca ctt gtt cag gaa tgg act	6595
Gly Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr	
2105 2110 2115	
gtg cag cgg cca ggg cag acg tgc cag ccc atc ctg gag gag cag	6640
Val Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln	

ES 2 672 320 T3

	2120		2125		2130	
tgt ctt gtc ccc gac agc tcc cac tgc cag gtc ctc ctc tta cca						6685
Cys Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro	2135		2140		2145	
ctg ttt gct gaa tgc cac aag gtc ctg gct cca gcc aca ttc tat						6730
Leu Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr	2150		2155		2160	
gcc atc tgc cag cag gac agt tgc cac cag gag caa gtg tgt gag						6775
Ala Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu	2165		2170		2175	
gtg atc gcc tct tat gcc cac ctc tgt cgg acc aac ggg gtc tgc						6820
Val Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys	2180		2185		2190	
gtt gac tgg agg aca cct gat ttc tgt gct atg tca tgc cca cca						6865
Val Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro	2195		2200		2205	
tct ctg gtc tac aac cac tgt gag cat ggc tgt ccc cgg cac tgt						6910
Ser Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys	2210		2215		2220	
gat ggc aac gtg agc tcc tgt ggg gac cat ccc tcc gaa ggc tgt						6955
Asp Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys	2225		2230		2235	
ttc tgc cct cca gat aaa gtc atg ttg gaa ggc agc tgt gtc cct						7000
Phe Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro	2240		2245		2250	
gaa gag gcc tgc act cag tgc att ggt gag gat gga gtc cag cac						7045
Glu Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His	2255		2260		2265	
cag ttc ctg gaa gcc tgg gtc ccg gac cac cag ccc tgt cag atc						7090
Gln Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile	2270		2275		2280	
tgc aca tgc ctc agc ggg cgg aag gtc aac tgc aca acg cag ccc						7135
Cys Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro	2285		2290		2295	
tgc ccc acg gcc aaa gct ccc acg tgt ggc ctg tgt gaa gta gcc						7180
Cys Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala	2300		2305		2310	
cgc ctc cgc cag aat gca gac cag tgc tgc ccc gag tat gag tgt						7225
Arg Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys	2315		2320		2325	
gtg tgt gac cca gtg agc tgt gac ctg ccc cca gtg cct cac tgt						7270
Val Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys	2330		2335		2340	
gaa cgt ggc ctc cag ccc aca ctg acc aac cct ggc gag tgc aga						7315
Glu Arg Gly Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg	2345		2350		2355	
ccc aac ttc acc tgc gcc tgc agg aag gag gag tgc aaa aga gtg						7360

ES 2 672 320 T3

Pro	Asn	Phe	Thr	Cys	Ala	Cys	Arg	Lys	Glu	Glu	Cys	Lys	Arg	Val		
				2360					2365					2370		
tcc	cca	ccc	tcc	tgc	ccc	ccg	cac	cgt	ttg	ccc	acc	ctt	cgg	aag		7405
Ser	Pro	Pro	Ser	Cys	Pro	Pro	His	Arg	Leu	Pro	Thr	Leu	Arg	Lys		2385
				2375					2380					2385		
acc	cag	tgc	tgt	gat	gag	tat	gag	tgt	gcc	tgc	aac	tgt	gtc	aac		7450
Thr	Gln	Cys	Cys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Cys	Ala	Cys	Asn	Cys	Val	Asn		2400
				2390					2395					2400		
tcc	aca	gtg	agc	tgt	ccc	ctt	ggg	tac	ttg	gcc	tca	act	gcc	acc		7495
Ser	Thr	Val	Ser	Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ser	Thr	Ala	Thr		2415
				2405					2410					2415		
aat	gac	tgt	ggc	tgt	acc	aca	acc	acc	tgc	ctt	ccc	gac	aag	gtg		7540
Asn	Asp	Cys	Gly	Cys	Thr	Thr	Thr	Thr	Cys	Leu	Pro	Asp	Lys	Val		2430
				2420					2425					2430		
tgt	gtc	cac	cga	agc	acc	atc	tac	cct	gtg	ggc	cag	ttc	tgg	gag		7585
Cys	Val	His	Arg	Ser	Thr	Ile	Tyr	Pro	Val	Gly	Gln	Phe	Trp	Glu		2445
				2435					2440					2445		
gag	ggc	tgc	gat	gtg	tgc	acc	tgc	acc	gac	atg	gag	gat	gcc	gtg		7630
Glu	Gly	Cys	Asp	Val	Cys	Thr	Cys	Thr	Asp	Met	Glu	Asp	Ala	Val		2460
				2450					2455					2460		
atg	ggc	ctc	cgc	gtg	gcc	cag	tgc	tcc	cag	aag	ccc	tgt	gag	gac		7675
Met	Gly	Leu	Arg	Val	Ala	Gln	Cys	Ser	Gln	Lys	Pro	Cys	Glu	Asp		2475
				2465					2470					2475		
agc	tgt	cgg	tcg	ggc	ttc	act	tac	gtt	ctg	cat	gaa	ggc	gag	tgc		7720
Ser	Cys	Arg	Ser	Gly	Phe	Thr	Tyr	Val	Leu	His	Glu	Gly	Glu	Cys		2490
				2480					2485					2490		
tgt	gga	agg	tgc	ctg	cca	tct	gcc	tgt	gag	gtg	gtg	act	ggc	tca		7765
Cys	Gly	Arg	Cys	Leu	Pro	Ser	Ala	Cys	Glu	Val	Val	Thr	Gly	Ser		2505
				2495					2500					2505		
ccg	cgg	ggg	gac	tcc	cag	tct	tcc	tgg	aag	agt	gtc	ggc	tcc	cag		7810
Pro	Arg	Gly	Asp	Ser	Gln	Ser	Ser	Trp	Lys	Ser	Val	Gly	Ser	Gln		2515
				2510					2515					2520		
tgg	gcc	tcc	ccg	gag	aac	ccc	tgc	ctc	atc	aat	gag	tgt	gtc	cga		7855
Trp	Ala	Ser	Pro	Glu	Asn	Pro	Cys	Leu	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Arg		2535
				2525					2530					2535		
gtg	aag	gag	gag	gtc	ttt	ata	caa	caa	agg	aac	gtc	tcc	tgc	ccc		7900
Val	Lys	Glu	Glu	Val	Phe	Ile	Gln	Gln	Arg	Asn	Val	Ser	Cys	Pro		2550
				2540					2545					2550		
cag	ctg	gag	gtc	cct	gtc	tgc	ccc	tcg	ggc	ttt	cag	ctg	agc	tgt		7945
Gln	Leu	Glu	Val	Pro	Val	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Gln	Leu	Ser	Cys		2565
				2555					2560					2565		
aag	acc	tca	gcg	tgc	tgc	cca	agc	tgt	cgc	tgt	gag	cgc	atg	gag		7990
Lys	Thr	Ser	Ala	Cys	Cys	Pro	Ser	Cys	Arg	Cys	Glu	Arg	Met	Glu		2580
				2570					2575					2580		
gcc	tgc	atg	ctc	aat	ggc	act	gtc	att	ggg	ccc	ggg	aag	act	gtg		8035
Ala	Cys	Met	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Ile	Gly	Pro	Gly	Lys	Thr	Val		2595
				2585					2590					2595		

ES 2 672 320 T3

atg atc gat gtg tgc acg acc tgc cgc tgc atg gtg cag gtg ggg	8080
Met Ile Asp Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly	
2600 2605 2610	
gtc atc tct gga ttc aag ctg gag tgc agg aag acc acc tgc aac	8125
Val Ile Ser Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn	
2615 2620 2625	
ccc tgc ccc ctg ggt tac aag gaa gaa aat aac aca ggt gaa tgt	8170
Pro Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys	
2630 2635 2640	
tgt ggg aga tgt ttg cct acg gct tgc acc att cag cta aga gga	8215
Cys Gly Arg Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly	
2645 2650 2655	
gga cag atc atg aca ctg aag cgt gat gag acg ctc cag gat ggc	8260
Gly Gln Ile Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly	
2660 2665 2670	
tgt gat act cac ttc tgc aag gtc aat gag aga gga gag tac ttc	8305
Cys Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe	
2675 2680 2685	
tgg gag aag agg gtc aca ggc tgc cca ccc ttt gat gaa cac aag	8350
Trp Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys	
2690 2695 2700	
tgt ctg gct gag gga ggt aaa att atg aaa att cca ggc acc tgc	8395
Cys Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys	
2705 2710 2715	
tgt gac aca tgt gag gag cct gag tgc aac gac atc act gcc agg	8440
Cys Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg	
2720 2725 2730	
ctg cag tat gtc aag gtg gga agc tgt aag tct gaa gta gag gtg	8485
Leu Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val	
2735 2740 2745	
gat atc cac tac tgc cag ggc aaa tgt gcc agc aaa gcc atg tac	8530
Asp Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr	
2750 2755 2760	
tcc att gac atc aac gat gtg cag gac cag tgc tcc tgc tgc tct	8575
Ser Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser	
2765 2770 2775	
ccg aca cgg acg gag ccc atg cag gtg gcc ctg cac tgc acc aat	8620
Pro Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn	
2780 2785 2790	
ggc tct gtt gtg tac cat gag gtt ctc aat gcc atg gag tgc aaa	8665
Gly Ser Val Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys	
2795 2800 2805	
tgc tcc ccc agg aag tgc agc aag tga ggctgctgca gctgcatggg	8712
Cys Ser Pro Arg Lys Cys Ser Lys	
2810	
tgcttgcctgc tgcttgcctt ggcttgcctt ccaggccaga gtgctgccag tcttctgcat	8772
ggttctgctt tgtgcccctt tgagcccaca ataaaggctg agctcttctc ttgcaaaaagg	8832

C

- <210> 10
- <211> 2813
- <212> PRT
- 5 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
195 200 205

ES 2 672 320 T3

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
 210 215 220

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu
 225 230 235 240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu
 245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala
 260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His
 275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys
 290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met
 305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu
 325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His
 340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn
 355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys
 370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp
 385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
 405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
 420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
 435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
 450 455 460

ES 2 672 320 T3

Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
705 710 715 720

ES 2 672 320 T3

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
785 790 795 800

Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
835 840 845

Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
850 855 860

Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly
865 870 875 880

Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
885 890 895

Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys
900 905 910

Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu
915 920 925

Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys
930 935 940

Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg
945 950 955 960

Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg

ES 2 672 320 T3

			965						970						975
His	Leu	Ser	Ile	Ser	Val	Val	Leu	Lys	Gln	Thr	Tyr	Gln	Glu	Lys	Val
			980					985					990		
Cys	Gly	Leu	Cys	Gly	Asn	Phe	Asp	Gly	Ile	Gln	Asn	Asn	Asp	Leu	Thr
		995					1000					1005			
Ser	Ser	Asn	Leu	Gln	Val	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Asp	Phe	Gly	Asn	
	1010					1015					1020				
Ser	Trp	Lys	Val	Ser	Ser	Gln	Cys	Ala	Asp	Thr	Arg	Lys	Val	Pro	
	1025					1030					1035				
Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Ala	Thr	Cys	His	Asn	Asn	Ile	Met	Lys	Gln	
	1040					1045					1050				
Thr	Met	Val	Asp	Ser	Ser	Cys	Arg	Ile	Leu	Thr	Ser	Asp	Val	Phe	
	1055					1060					1065				
Gln	Asp	Cys	Asn	Lys	Leu	Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Tyr	Leu	Asp	Val	
	1070					1075					1080				
Cys	Ile	Tyr	Asp	Thr	Cys	Ser	Cys	Glu	Ser	Ile	Gly	Asp	Cys	Ala	
	1085					1090					1095				
Cys	Phe	Cys	Asp	Thr	Ile	Ala	Ala	Tyr	Ala	His	Val	Cys	Ala	Gln	
	1100					1105					1110				
His	Gly	Lys	Val	Val	Thr	Trp	Arg	Thr	Ala	Thr	Leu	Cys	Pro	Gln	
	1115					1120					1125				
Ser	Cys	Glu	Glu	Arg	Asn	Leu	Arg	Glu	Asn	Gly	Tyr	Glu	Cys	Glu	
	1130					1135					1140				
Trp	Arg	Tyr	Asn	Ser	Cys	Ala	Pro	Ala	Cys	Gln	Val	Thr	Cys	Gln	
	1145					1150					1155				
His	Pro	Glu	Pro	Leu	Ala	Cys	Pro	Val	Gln	Cys	Val	Glu	Gly	Cys	
	1160					1165					1170				
His	Ala	His	Cys	Pro	Pro	Gly	Lys	Ile	Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Gln	
	1175					1180					1185				
Thr	Cys	Val	Asp	Pro	Glu	Asp	Cys	Pro	Val	Cys	Glu	Val	Ala	Gly	
	1190					1195					1200				

ES 2 672 320 T3

Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp
 1205 1210 1215

Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr
 1220 1225 1230

Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr
 1235 1240 1245

Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser
 1250 1255 1260

Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu
 1265 1270 1275

Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe
 1280 1285 1290

Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg
 1295 1300 1305

Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp
 1310 1315 1320

Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser
 1325 1330 1335

Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln
 1340 1345 1350

Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile
 1355 1360 1365

Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu
 1370 1375 1380

Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val
 1385 1390 1395

Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro
 1400 1405 1410

Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile
 1415 1420 1425

Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val
 1430 1435 1440

ES 2 672 320 T3

Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys
 1445 1450 1455
 Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro Asp Met
 1460 1465 1470
 Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu
 1475 1480 1485
 Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu
 1490 1495 1500
 Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys
 1505 1510 1515
 Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp
 1520 1525 1530
 Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val
 1535 1540 1545
 Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln
 1550 1555 1560
 Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr
 1565 1570 1575
 Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser
 1580 1585 1590
 Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr
 1595 1600 1605
 Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile
 1610 1615 1620
 Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu
 1625 1630 1635
 Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp
 1640 1645 1650
 Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg
 1655 1660 1665
 Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala
 1670 1675 1680

ES 2 672 320 T3

Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly
 1685 1690 1695

Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe
 1700 1705 1710

Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr
 1715 1720 1725

Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val
 1730 1735 1740

Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val
 1745 1750 1755

Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala
 1760 1765 1770

Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala
 1775 1780 1785

Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val
 1790 1795 1800

Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn
 1805 1810 1815

Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala
 1820 1825 1830

Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val
 1835 1840 1845

Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val Thr Leu
 1850 1855 1860

Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg Ile
 1865 1870 1875

Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp
 1880 1885 1890

Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly
 1895 1900 1905

Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu

ES 2 672 320 T3

1910						1915						1920			
Arg	Pro	Ser	Cys	Pro	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Val	Lys	Val	Glu	Glu	
1925						1930					1935				
Thr	Cys	Gly	Cys	Arg	Trp	Thr	Cys	Pro	Cys	Val	Cys	Thr	Gly	Ser	
1940						1945					1950				
Ser	Thr	Arg	His	Ile	Val	Thr	Phe	Asp	Gly	Gln	Asn	Phe	Lys	Leu	
1955						1960					1965				
Thr	Gly	Ser	Cys	Ser	Tyr	Val	Leu	Phe	Gln	Asn	Lys	Glu	Gln	Asp	
1970						1975					1980				
Leu	Glu	Val	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Cys	Ser	Pro	Gly	Ala	Arg	
1985						1990					1995				
Gln	Gly	Cys	Met	Lys	Ser	Ile	Glu	Val	Lys	His	Ser	Ala	Leu	Ser	
2000						2005					2010				
Val	Glu	Leu	His	Ser	Asp	Met	Glu	Val	Thr	Val	Asn	Gly	Arg	Leu	
2015						2020					2025				
Val	Ser	Val	Pro	Tyr	Val	Gly	Gly	Asn	Met	Glu	Val	Asn	Val	Tyr	
2030						2035					2040				
Gly	Ala	Ile	Met	His	Glu	Val	Arg	Phe	Asn	His	Leu	Gly	His	Ile	
2045						2050					2055				
Phe	Thr	Phe	Thr	Pro	Gln	Asn	Asn	Glu	Phe	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser	
2060						2065					2070				
Pro	Lys	Thr	Phe	Ala	Ser	Lys	Thr	Tyr	Gly	Leu	Cys	Gly	Ile	Cys	
2075						2080					2085				
Asp	Glu	Asn	Gly	Ala	Asn	Asp	Phe	Met	Leu	Arg	Asp	Gly	Thr	Val	
2090						2095					2100				
Thr	Thr	Asp	Trp	Lys	Thr	Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Thr	Val	Gln	Arg	
2105						2110					2115				
Pro	Gly	Gln	Thr	Cys	Gln	Pro	Ile	Leu	Glu	Glu	Gln	Cys	Leu	Val	
2120						2125					2130				
Pro	Asp	Ser	Ser	His	Cys	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Phe	Ala	
2135						2140					2145				

ES 2 672 320 T3

Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala Ile Cys
 2150 2155 2160
 Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val Ile Ala
 2165 2170 2175
 Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp Trp
 2180 2185 2190
 Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val
 2195 2200 2205
 Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp Gly Asn
 2210 2215 2220
 Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe Cys Pro
 2225 2230 2235
 Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu Glu Ala
 2240 2245 2250
 Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu
 2255 2260 2265
 Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys
 2270 2275 2280
 Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr
 2285 2290 2295
 Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg
 2300 2305 2310
 Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp
 2315 2320 2325
 Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly
 2330 2335 2340
 Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe
 2345 2350 2355
 Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro
 2360 2365 2370
 Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys
 2375 2380 2385

ES 2 672 320 T3

Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val
 2390 2395 2400
 Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys
 2405 2410 2415
 Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His
 2420 2425 2430
 Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys
 2435 2440 2445
 Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu
 2450 2455 2460
 Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg
 2465 2470 2475
 Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg
 2480 2485 2490
 Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro Arg Gly
 2495 2500 2505
 Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp Ala Ser
 2510 2515 2520
 Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val Lys Glu
 2525 2530 2535
 Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu
 2540 2545 2550
 Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser
 2555 2560 2565
 Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala Cys Met
 2570 2575 2580
 Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met Ile Asp
 2585 2590 2595
 Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val Ile Ser
 2600 2605 2610
 Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro Cys Pro
 2615 2620 2625

ES 2 672 320 T3

Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys Gly Arg
 2630 2635 2640

 Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly Gln Ile
 2645 2650 2655

 Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys Asp Thr
 2660 2665 2670

 His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys
 2675 2680 2685

 Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala
 2690 2695 2700

 Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr
 2705 2710 2715

 Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr
 2720 2725 2730

 Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His
 2735 2740 2745

 Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp
 2750 2755 2760

 Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg
 2765 2770 2775

 Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val
 2780 2785 2790

 Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro
 2795 2800 2805

 Arg Lys Cys Ser Lys
 2810

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir el factor de von Willebrand (VWF) sin usar un agonista de la aglutinación plaquetaria, comprendiendo el método las etapas de:
 - 5 proporcionar una superficie que comprende glucoproteína plaquetaria inmovilizada Iba (GPIba) o un fragmento funcional de la misma, en donde la GPIba inmovilizada o fragmento funcional de la misma comprende al menos dos mutaciones seleccionadas entre el grupo que consiste en G233V, D235Y y M239V relativas a la SEQ ID NO: 2, en donde una de las mutaciones es D235Y;
 - 10 poner en contacto una muestra que tiene o se sospecha que tiene VWF con la superficie, en donde la puesta en contacto se hace sin un agonista de la agregación plaquetaria; y
 - detectar un complejo de VWF y GPIba.
2. El método según la reivindicación 1, en donde:
 - (a) la superficie es una superficie de fase sólida y el método es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o
 - 15 (b) la superficie es una superficie celular y el método es una citometría de flujo (FC) o un ensayo de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS); o
3. El método según la reivindicación 1, en donde la superficie es la superficie de una célula hospedadora que no expresa nativamente GPIba y el método de detección es la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS).
- 20 4. El método según la reivindicación 3, en donde la superficie es la superficie de una célula hospedadora seleccionada entre el grupo que consiste en un ovocito de *Xenopus*, una célula CHO-K1, una célula L929, una célula HEK-293T, una célula COS-7 y una célula S2, en donde la célula hospedadora se construye mediante ingeniería genética para que comprenda un polinucleótido que codifica GPIba o un fragmento funcional de la misma que tiene las al menos dos mutaciones elegidas entre el grupo consistente en G233V, D235Y y M239V con relación a la SEQ ID NO: 2, en donde una de las mutaciones es D235Y.
- 25 5. El método según la reivindicación 1, en donde la superficie es una superficie de fase sólida y el método de detección es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).
6. El método según la reivindicación 1, en donde la superficie es la superficie de una célula hospedadora, y en donde la célula hospedadora no expresa nativamente GPIba, preferiblemente en donde:
 - 30 (a) la célula hospedadora para la superficie de célula hospedadora se selecciona entre el grupo consistente en un ovocito de *Xenopus*, una célula CHO-K1, una célula L929, una célula HEK-293T, una célula COS-7 y una célula S2, y en donde la célula hospedadora se construye mediante ingeniería genética para que comprenda un polinucleótido que codifica GPIba o un fragmento funcional de la misma que tiene las al menos dos mutaciones elegidas entre el grupo consistente en G233V, D235Y y M239V con relación a la SEQ ID NO: 2, en donde una de las mutaciones es D235Y; o
 - 35 (b) la superficie de la célula hospedadora comprende también glucoproteína Ib β (GPIb β) y opcionalmente glucoproteína IX (GP-IX), en donde GPIb β comprende la SEQ ID NO: 4 y GP-IX comprende SEQ ID NO: 8.
7. El método según la reivindicación 1, en donde la superficie es una superficie de fase sólida seleccionada entre el grupo consistente en agarosa, vidrio, látex y material plástico, preferiblemente en donde la superficie de fase sólida comprende un anticuerpo anti-GPIba que se une a la GPIba o a un fragmento funcional de la misma.
- 40 8. El método según la reivindicación 1, en donde:
 - (a) la muestra es plasma; o
 - (b) se usa un anticuerpo anti-VWF marcado, para detectar el complejo de VWF y GPIba.
9. El método según la reivindicación 1, en donde las al menos dos mutaciones se eligen entre el grupo consistente en D235Y/G233V y D235Y/M239V con relación a la SEQ ID NO: 2.
- 45 10. El método según la reivindicación 1, en donde las al menos dos mutaciones son D235Y/G233V/M239V con relación a la SEQ ID NO: 2.
11. Un *kit* para la medida del factor de von Willebrand activo (VWF), comprendiendo el kit:

glucoproteína plaquetaria Iba (GPIba) recombinante o un fragmento funcional de la misma, en donde la GPIba o el fragmento funcional de la misma comprende al menos dos mutaciones seleccionadas entre el grupo consistente en G233V, D235Y y M239V con relación a la SEQ ID NO: 2, en donde una de las mutaciones es D235Y; y

un reactivo para detectar un complejo de VWF y GPIba.

- 5 12. El *kit* según la reivindicación 11, en donde:
- (a) el reactivo es un anticuerpo anti-VWF marcado;
- (b) el control es una muestra de plasma de un individuo que no tiene la enfermedad de von Willebrand (VWD);
- (c) la GPIba o fragmento funcional de la misma que tiene las al menos dos mutaciones seleccionadas entre el grupo consistente en G233V, D235Y y M239V con relación a la SEQ ID NO: 2, en donde una de las mutaciones es D235Y, está inmovilizada sobre una superficie; o
- 10 (d) las al menos dos mutaciones se eligen entre el grupo consistente en D235Y/G233V, D235Y/M239V y D235Y/G233V/M239V con relación a la SEQ ID NO: 2.
13. El *kit* según la reivindicación 12 (c), en donde la superficie es una superficie de célula hospedadora, y en donde la célula hospedadora no expresa nativamente GPIba.
- 15 14. El *kit* según la reivindicación 13, en donde:
- (a) la célula hospedadora para la superficie de célula hospedadora se selecciona entre el grupo consistente en un ovocito de *Xenopus*, una célula CHO-K1, una célula L929, una célula HEK-293T, una célula COS-7 y una célula S2, y en donde la célula hospedadora se construye mediante ingeniería genética para que comprenda un polinucleótido que codifica GPIba o un fragmento funcional de la misma que tiene las al menos dos mutaciones elegidas entre el grupo consistente en G233V, D235Y y M239V con relación a la SEQ ID NO: 2, en donde una de las mutaciones es D235Y; o
- 20 (b) la superficie de la célula hospedadora comprende también glucoproteína Ib β (GPIb β) y opcionalmente glucoproteína IX (GP-IX), en donde GPIb β comprende la SEQ ID NO: 4 y GP-IX comprende SEQ ID NO: 8.
- 25 15. El *kit* según la reivindicación 12 (c), en donde la superficie es una superficie de fase sólida seleccionada entre el grupo consistente en agarosa, vidrio, látex y material plástico, preferiblemente en donde la superficie de fase sólida comprende un anticuerpo anti-GPIba que se une a la GPIba o a un fragmento funcional de la misma.

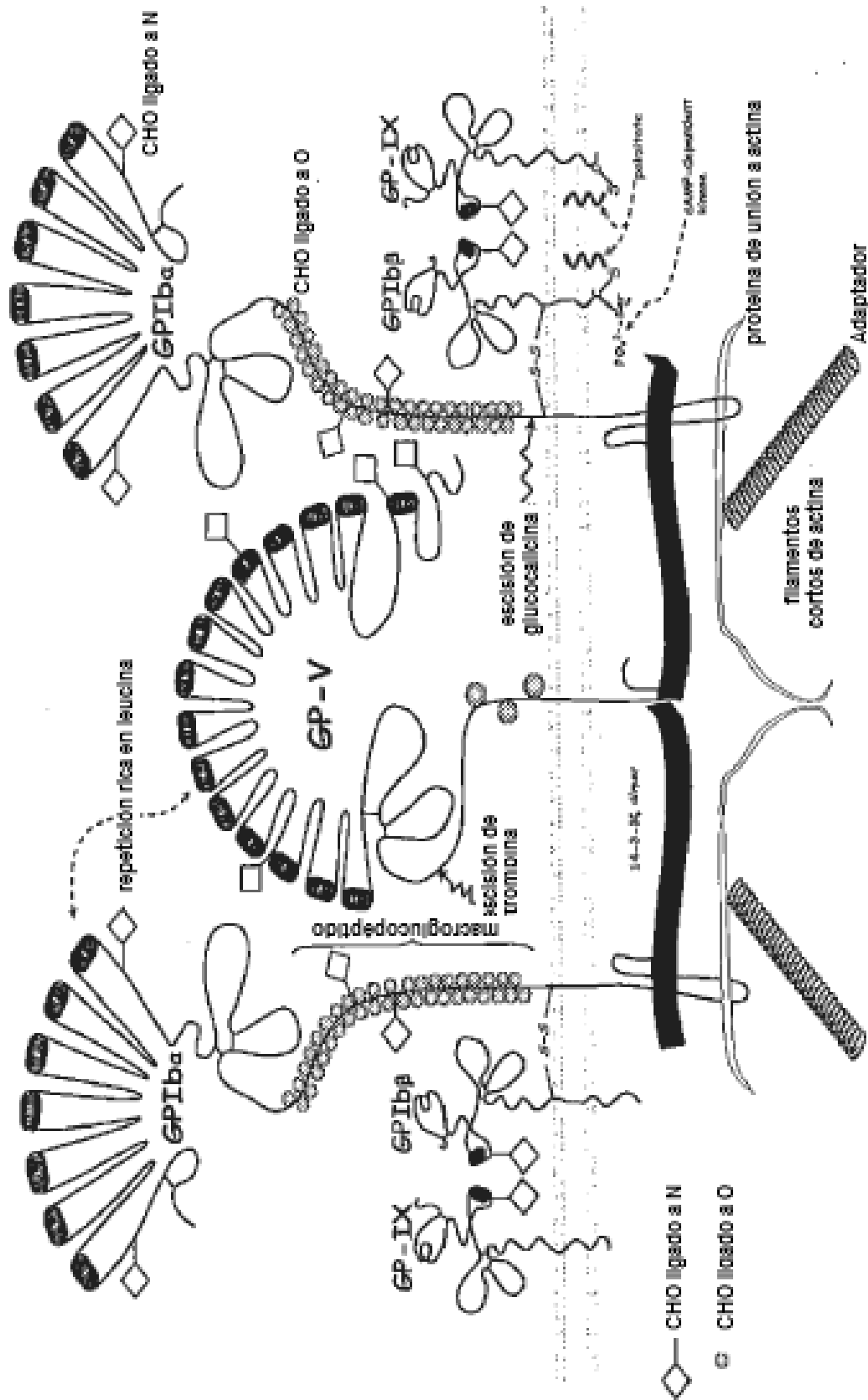


FIG. 1

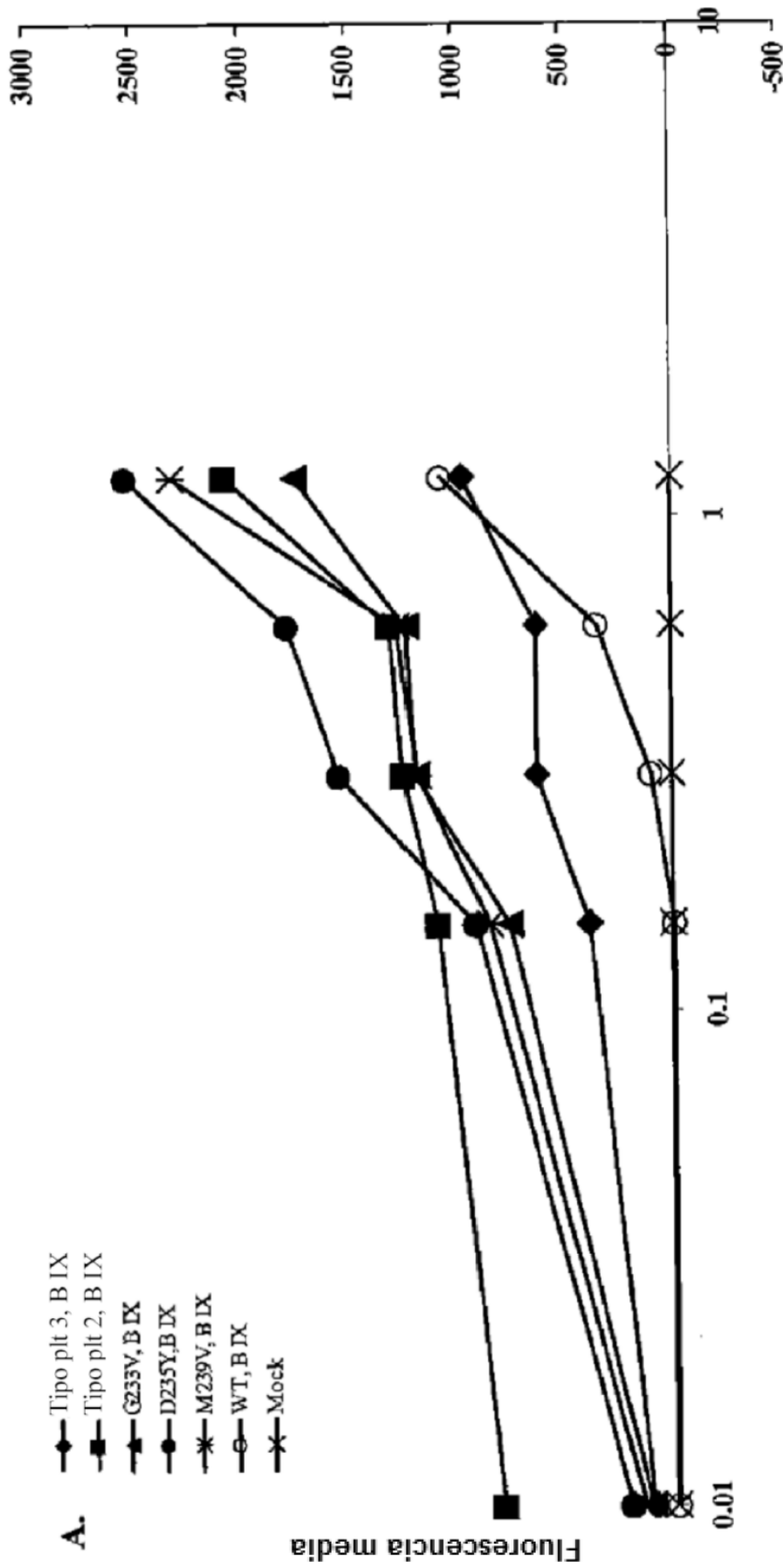


FIG. 2

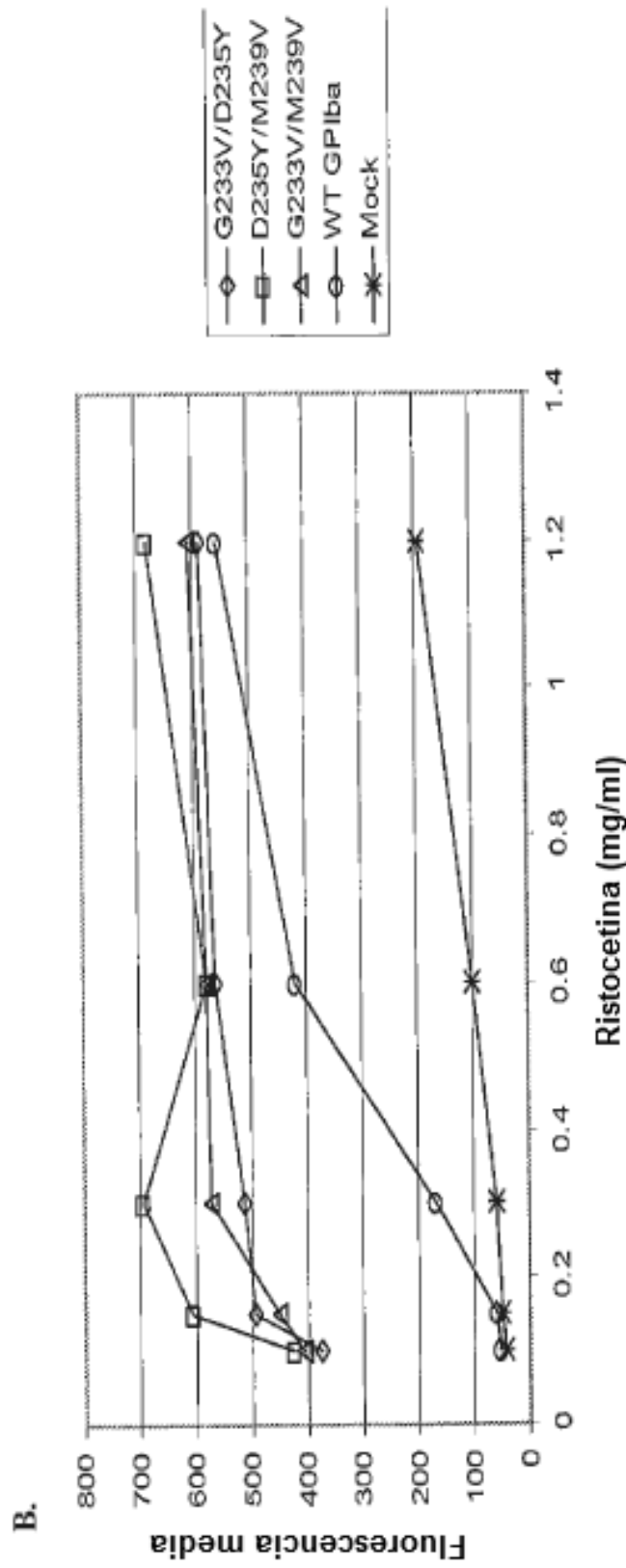


FIG. 2

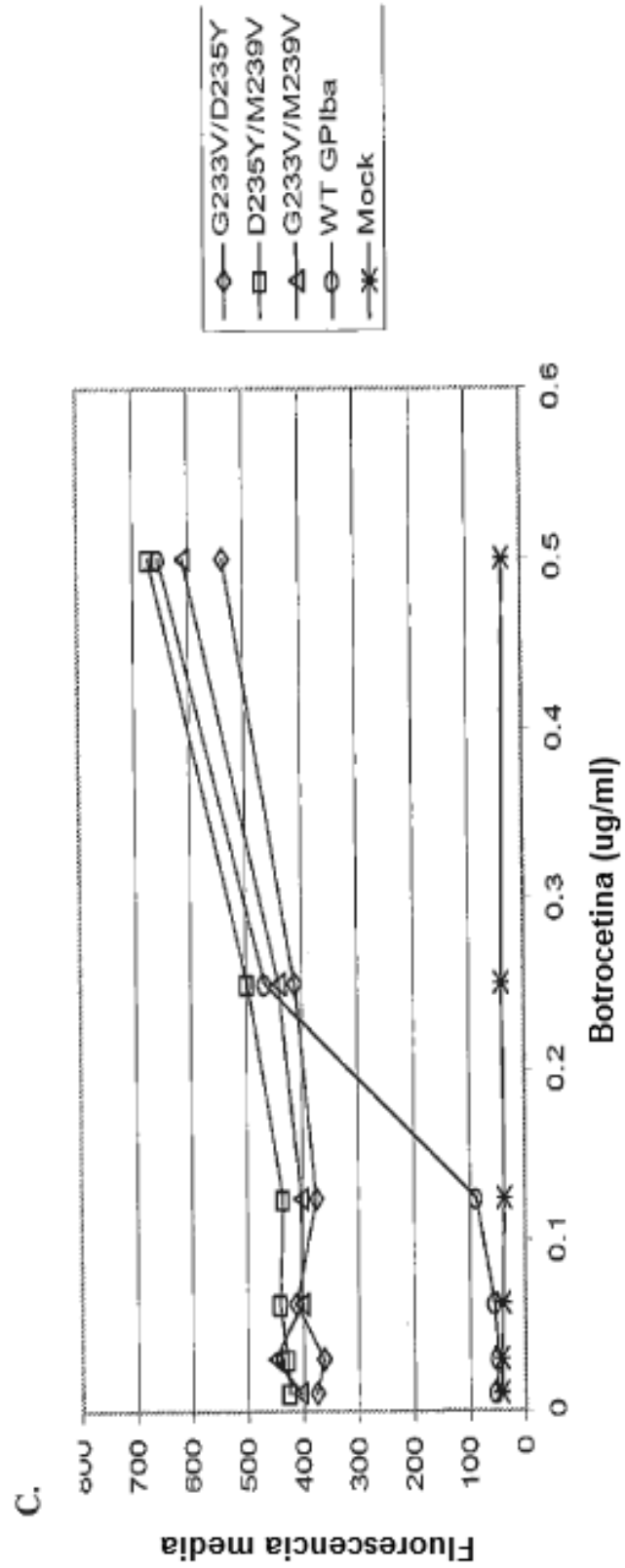


FIG. 2

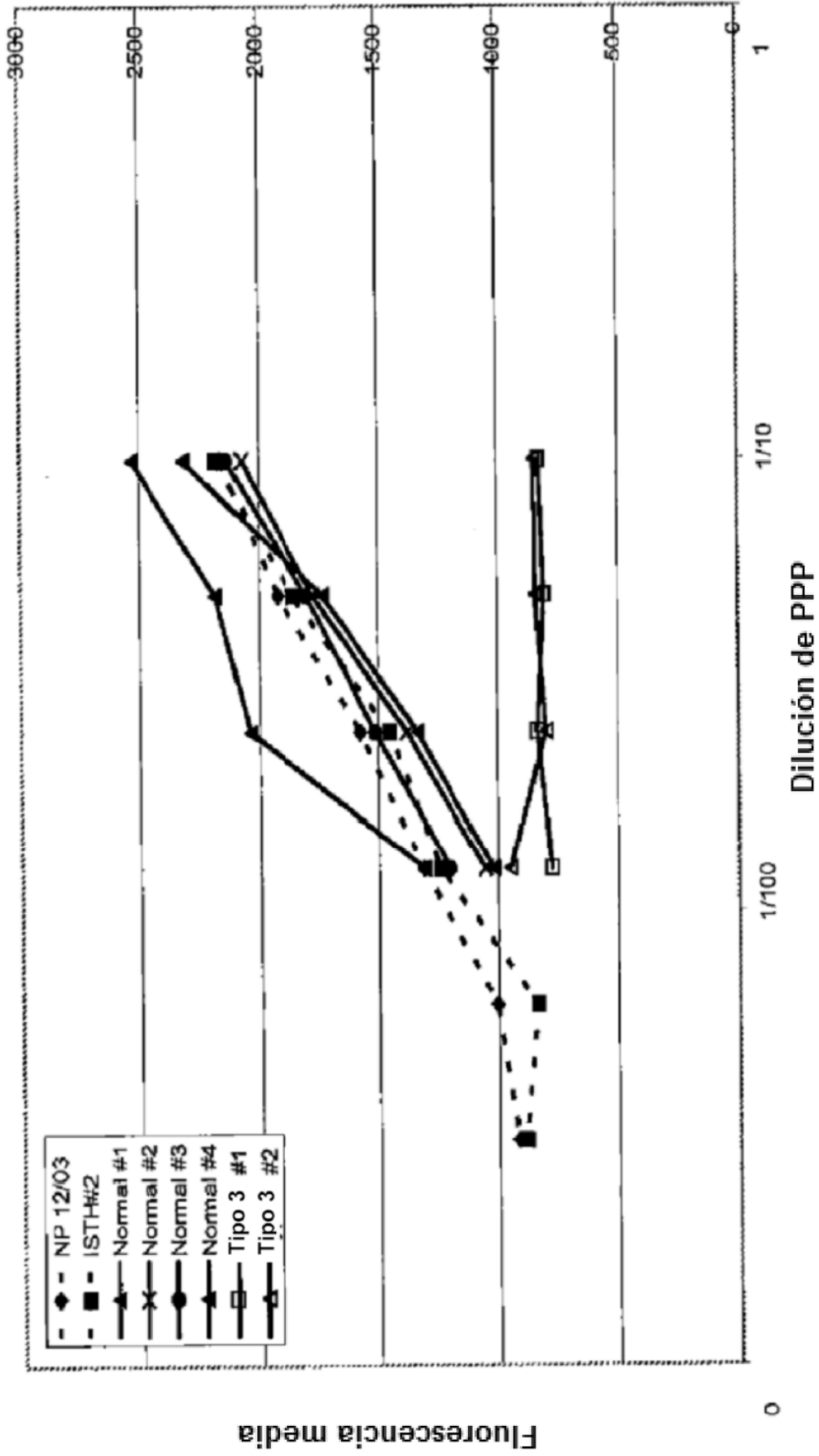


FIG. 3

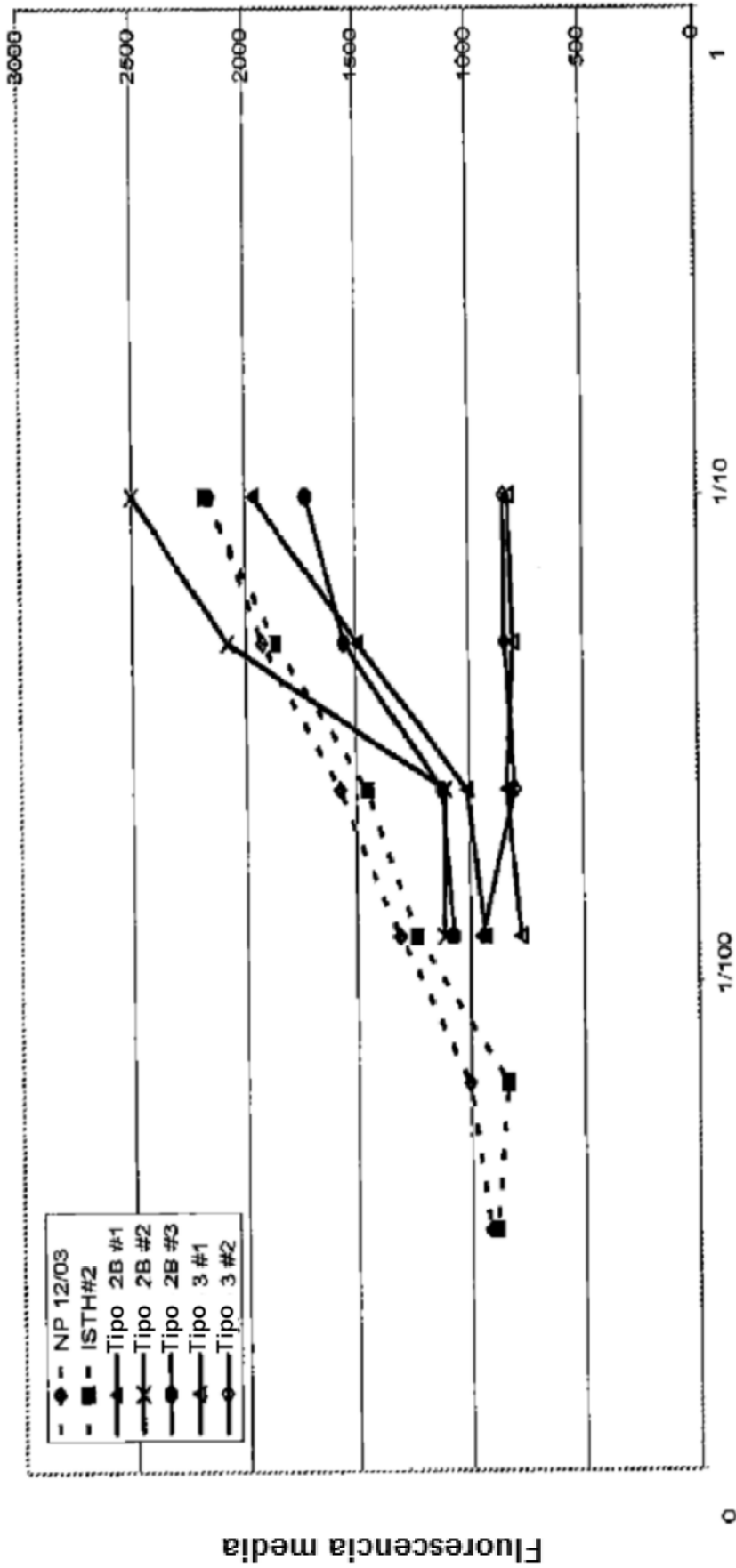


FIG. 4

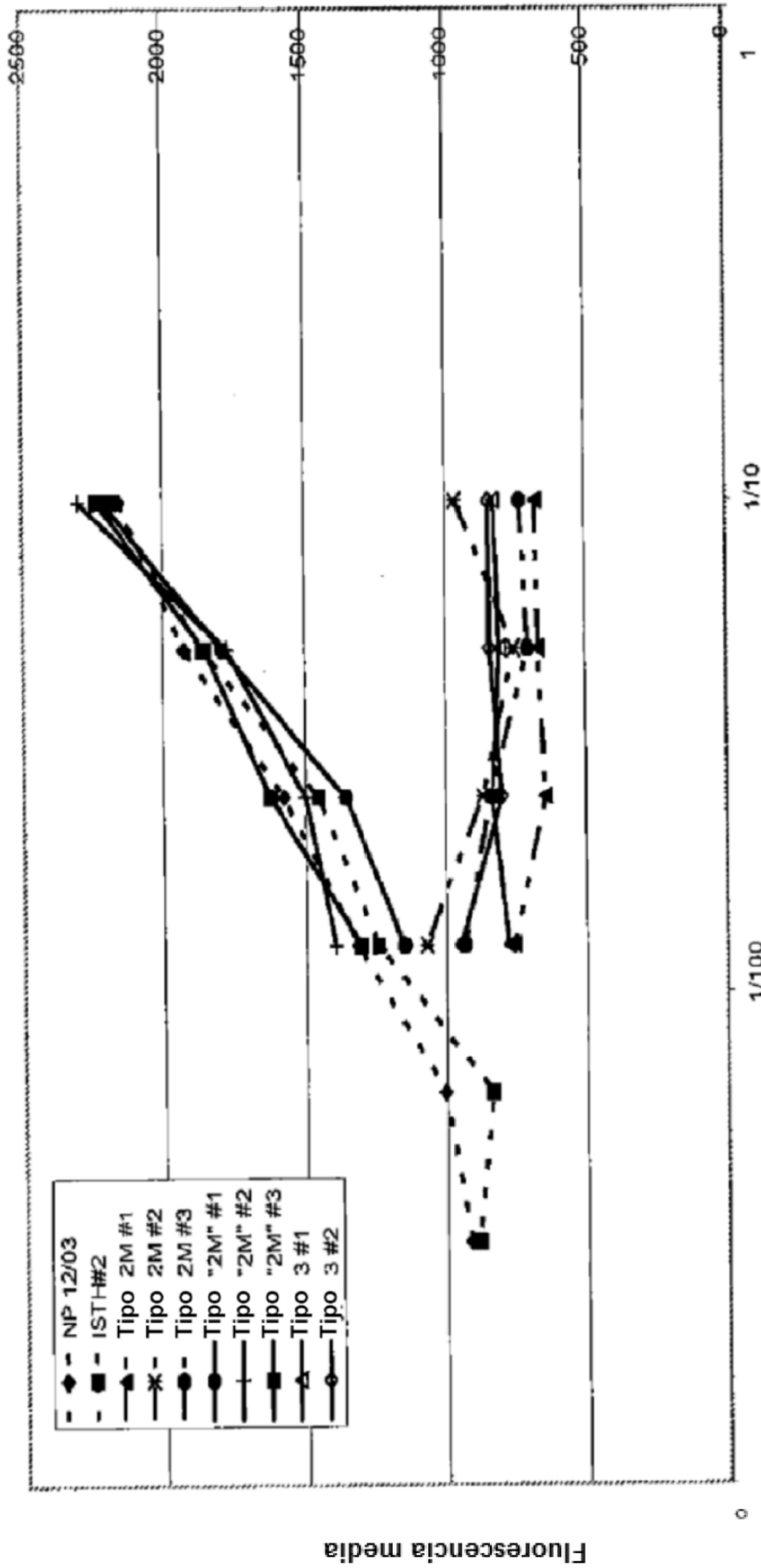


FIG. 5

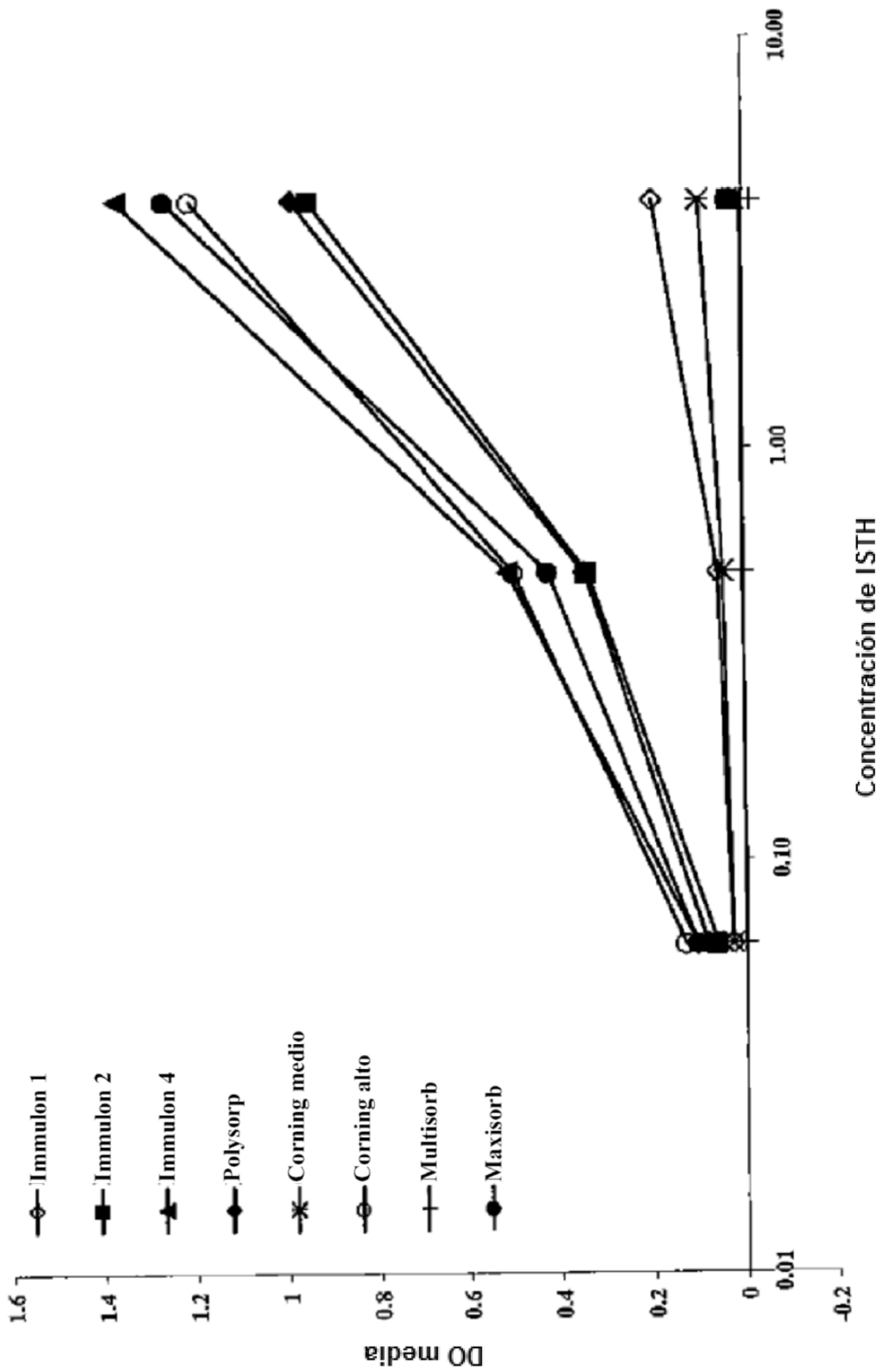


FIG. 6