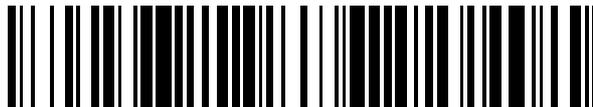


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 415**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06835684 .9**

96 Fecha de presentación: **22.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1989323**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.2008**

54

Título: **PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO QUE IMPLICAN LA DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE GENES Y DE SNP EN EL GRUPO DE GENES FC RII/FC RIII Y SONDAS PARA UTILIZAR EN DICHS PROCEDIMIENTOS PARA DETECTAR LA SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDADES AUTOINMUNES Y LA EFICACIA DE SU TRATAMIENTO.**

30

Prioridad:
22.12.2005 EP 05077984

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.11.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.11.2011

73

Titular/es:
**STICHTING SANQUIN BLOEDVOORZIENING
PLESMANLAAN 125
1066 CX AMSTERDAM, NL**

72

Inventor/es:
**ROOS, Dirk y
KUIJPERS, Taco Willem**

74

Agente: **Durán Moya, Carlos**

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).

ES 2 369 415 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de diagnóstico que implican la determinación del número de copias de genes y de SNP en el grupo de genes FC RII/FC RIII y sondas para utilizar en dichos procedimientos para detectar la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes y la eficacia de su tratamiento

La presente invención se refiere a los sectores de la inmunología y la medicina molecular. En particular, se refiere a procedimientos de diagnóstico que implican la determinación de la cantidad de genes intactos del grupo de genes Fc γ RII/Fc γ RIII y la utilización de los mismos en tratamiento de enfermedades, por ejemplo, para predecir si un individuo está predispuesto a contraer una enfermedad o para predecir la respuesta terapéutica de un paciente individual. También se refiere a las sondas y construcciones de ácidos nucleicos para utilizar en dichos procedimientos.

La secuenciación del genoma humano ha dado lugar a muchos avances técnicos y ha estimulado el descubrimiento de varios hitos de la genómica. Un área es el desarrollo de un amplio conjunto de marcadores polimórficos para el mapeo de genes. La forma más común de la variación de la secuencia de ADN es un polimorfismo de nucleótido simple (SNP), pero, además, existen polimorfismos de repetición de microsatélites y polimorfismos de inserción/delección. Mientras que los microsatélites y SNP han sido muy bien caracterizados en términos de su localización genómica y sus frecuencias en distintas poblaciones, los polimorfismos de inserción/delección no están tan bien caracterizados. Trabajos recientes (véase, por ejemplo, Sebat J. y otros, Large-scale copy number polymorphism (CNP) in the human genome. Science 2004, 305: 525-528) describen la identificación de grandes (de varias kilobases a megabases) deleciones y duplicaciones de fragmentos de ADN cuando se compararon genomas de individuos normales. La identificación y caracterización de los polimorfismos de número de copias (CNP) muestran que, además de diferencias de un solo nucleótido, los genomas de individuos no relacionados tienen grandes regiones de miles hasta millones de nucleótidos que son diferentes.

Desde una perspectiva funcional, las diferencias del número de copias del gen puede contribuir a la variación en la expresión génica. Los CNP de regiones de codificación y reguladoras es probable que puedan afectar la expresión de genes en los niveles de transcrito y/o proteína. Estudios de expresión génica han demostrado que diferencias sutiles en los niveles de expresión de genes tienen consecuencias significativas. Por ejemplo, el polimorfismo de número de copias del grupo de genes de las defensinas probablemente explica la variación natural en el nivel de expresión de DEFBA4 que, a su vez, podrían explicar las diferencias individuales en la defensa inmune (Linzmeier y otros, Genomics 2005; 86:423-30). Por otra parte, González y otros (Science. 2005; 307:1434-40) informaron que la posesión de un número de copias de *CCL3L1* menor que el promedio de la población se asocia con una susceptibilidad marcadamente aumentada del VIH/ síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Cappuzzo y otros (J. Natl Cancer Inst. 2005; 97:643-55) dieron a conocer que pacientes con cáncer de pulmón no de células pequeñas avanzado cuyas células tumorales contienen copias adicionales del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) pueden ser más propensas a responder al medicamento gefitinib (Iressa), y sugirieron que este elevado número de copias de genes puede ser una manera eficaz de determinar la eficacia de gefitinib.

Por lo tanto, se está acumulando evidencia de que los polimorfismos de número de copias (CNP) y su efecto global sobre la expresión de genes contribuye de manera significativa a la variación que subyace en las diferencias individuales en la predisposición a enfermedades complejas.

Es un objetivo de la presente invención dar a conocer nuevos marcadores de diagnóstico para enfermedades autoinmunes, en particular, marcadores que se pueden utilizar para predecir si a) el individuo está predispuesto para desarrollar una enfermedad autoinmune y, b) una vez que el individuo ha sido diagnosticado con una enfermedad autoinmune, si el individuo individual seguirá un curso severo o benigno de la enfermedad o si la enfermedad se desarrollará en una forma crónica y, c) si el individuo individual diagnosticado con una enfermedad autoinmune responderá a ciertos tipos de terapia.

Estos objetivos se cumplen por el descubrimiento que los genes del grupo de genes Fc γ RII/Fc γ RIII se utilizan de forma adecuada como marcadores de pronóstico para las principales enfermedades autoinmunes, así como para predecir el desarrollo de la enfermedad y/o la respuesta a la terapia con inmunoglobulina intravenosa (IgIV). Tal como se describe en detalle más adelante, los inventores se dedicaron a medir el número de copias y los SNP de genes en el grupo de genes Fc γ RII y Fc γ RIII humanos en el cromosoma 1q21-23. Mediante la utilización de cebadores diseñados para hibridar en las regiones de los genes Fc γ RII y RIII que son específicos para los genes, se determinó el número de copias de los genes Fc γ RII y Fc γ RIII en individuos humanos que sufren de una enfermedad autoinflamatoria. Más específicamente, los datos obtenidos de pacientes que sufren de una enfermedad autoinflamatoria en la infancia, la denominada enfermedad de Kawasaki, y de pacientes que tienen púrpura trombocitopénica inmune (ITP) se compararon con los individuos de control.

La enfermedad de Kawasaki es un síndrome febril agudo en la infancia, que se caracteriza por una vasculitis principalmente de las arterias de tamaño mediano. Puesto que no hay pruebas específicas para diagnosticar la

enfermedad, el diagnóstico se hace mediante criterios clínicos. En esta forma de vasculitis pediátrica, se utilizan altas dosis de infusiones de inmunoglobulina intravenosa como tratamiento estándar para prevenir la lesión de la arteria coronaria. Tal como se da a conocer en el presente documento, se encontró que los pacientes con la enfermedad de Kawasaki como promedio tienen una cantidad diferente del número habitual de dos genes *FCGR2B* por genoma, cuando se normalizaron en relación a varios genes de referencia (*CYBB* como gen ligado al cromosoma X, *SRY* como gen ligado al cromosoma Y y *ALB* que codifica la proteína plasmática albúmina de suero humana, como un gen autosómico). Las variaciones del número de copias del gen en los pacientes e individuos de control se muestran en los ejemplos más adelante. Burnea y otros (Genes Immun. 2005; 6(5): 438-44) dan a conocer la asociación de la variación genética en el gen de IL-4 o regiones unidas a éste y la susceptibilidad y patogénesis de la enfermedad de Kawasaki.

La ITP es una enfermedad caracterizada por trombocitopenia con líneas celulares normales de otra manera y sin otra explicación para la trombocitopenia aislada. La destrucción de las plaquetas sensibilizadas por anticuerpos por las células fagocíticas que contienen FcγR en el sistema retículoendotelial juega un papel importante, aunque la patofisiología exacta de este trastorno autoinmune no se conoce de forma precisa. El papel de los preceptores de Fc se ha subrayado por el hecho que el tratamiento con inmunoglobulina intravenosa (IVIg), a través del bloqueo de los receptores de Fc para IgG y la esplenectomía (extracción del órgano que destruye las plaquetas) son opciones de tratamiento eficaces. Dijkstra y otros (Trends Immunol. 2001; 22(9): 510-6) describen el tratamiento de enfermedades autoinmunes relacionadas con la desregulación de receptores de Fcγ, entre las que está púrpura trombocitopenia idiopática, con Ig intravenosa (IVIg).

Estudios anteriores relacionados con polimorfismos en el grupo de genes FCGR en pacientes con ITP muestran resultados contradictorios. En un estudio que involucró 116 pacientes con ITP, los presentes inventores encontraron una variación aumentada en el grupo de genes *FCGR2* y *FCGR3* en pacientes caucásicos en comparación con pacientes caucásicos sanos de control. Por ejemplo, un 82% de la población sana es homocigótica para un SNP que convierte una glutamina en el marco de lectura abierto (ORF) de *FCGR2C* en un codón de parada, haciendo de *FCGR2* un pseudogen no expresado. El resto (18%) de la población sana contiene *FCGR2-ORF*. Por el contrario, se encontró que el 36% de los pacientes con ITP portan, como mínimo, un alelo *FCGR2-ORF*, que da como resultado la expresión de un PcyRIIc funcionalmente activo. Además, se observó una diferencia significativa en la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo promotor -386G/C. El genotipo -386CC fue raro y solamente se observó en un paciente con ITP. En las mismas series de muestras de ADN, se confirmó que la sobrerrepresentación observada previamente del SNP en *FCGR3A* que codifica la variante PcyRIIa-158V, es la más prevalente en ITP con comienzo en la infancia ($p=0,0006$) y no en ITP con comienzo en la adultez ($p=0,3$).

Estos estudios indican que las cantidades relativas de FcγR activadoras contra inhibidoras son indicativas del desarrollo de una enfermedad autoinmune. Se ha informado anteriormente que anticuerpos contra FcγRII pedido por el solicitante el 13.4.11 podrían hacer una distinción entre sano y enfermo en autoinmunidad u otra, pero esto es correcto. Aunque la relevancia de dicho desequilibrio entre los receptores de FcγRII activadores e inhibidores se ha sugerido de forma repetida, hasta la fecha todos estos estudios se han basado en la utilización de anticuerpos no específicos que, en primer lugar, no pueden diferenciar entre las diferentes isoformas de FcγRII [Nakatani y otros, Clin. Exp. Immunol. 1999; 117:418-22; Van Wijngaarden y otros, Rheumatology 2003; 42:681-8]. Además, los autores a menudo se refieren a patrones de tinción con anticuerpos monoclonales (MoAbs) en células inmunes que se conoce que tienen niveles de expresión altamente variables de FcγRs debido a la activación in vivo o in vitro por factores de crecimiento, citoquinas o desencadenadores inflamatorios. La solicitud de patente de EEUU 2004/0186045 da a conocer anticuerpos que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que a FcγRIIA y un procedimiento para el diagnóstico de púrpura trombocitopenia idiopática empleando dichos anticuerpos. Los presentes inventores muestran que los "MoAbs específicos de FcγRIIB" recientemente desarrollados que siempre se había asumido que se unían exclusivamente a FcγRIIB, también se unen a células que expresan FcγRIIC. Debido a los dominios extracelulares idénticos de FcγRIIB y FcγRIIC, estas observaciones son de esperar en individuos que portan el alelo no común *FCGB2C-ORF* y, por lo tanto, que expresan FcγRIIC. En resumen, una estrategia genética para cuantificar la variabilidad de los CNP y SNP en el grupo de genes FCGR, preferentemente en un ensayo único tal como se ha propuesto por los presentes inventores, es la manera más fiable de ensayar la susceptibilidad a la enfermedad, la severidad de la enfermedad y la eficacia del tratamiento en procesos mediados por IgG a partir de cambios en este grupo de genes.

En el presente documento, la presente invención da a conocer un procedimiento para determinar si un individuo está predispuesto para desarrollar la enfermedad de Kawasaki o púrpura trombocitopénica idiopática que comprende la determinación en una muestra aislada de dicho individuo de la cantidad de los genes en el grupo de genes FcγRII/FcγRIII, comprendiendo dicho grupo de genes los genes *FCGR2C*, *FCGR3A*, *FCGR2A* y *FCGR3B*, que codifican un FcγR activador y *FCGR2B* que codifica un FcγR inhibidor, en el que la determinación de la cantidad de dichos genes comprende, como mínimo, determinar la presencia del gen *FCGR2C-ORF*, opcionalmente además comprende detectar un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en un exón, intrón y/o región promotora, como mínimo, de un gen seleccionado del grupo que comprende *FCGR2C*, *FCGR2B*, *FCGR3A*, *FCGR3A* y *FCGR3B*; y correlacionar dicha cantidad con la cantidad observada en una población sana, en el que una cantidad mayor del gen que codifica un FcγR activador (es decir, *FCGR2C*, *FCGR3A*, *FCGR2A* y *FCGR3B*) y/o una cantidad menor del

gen que codifica un FcγR inhibidor (es decir, *FCGR2B*) es indicativa de que tiene mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad de Kawasaki o ITP.

La expresión "FcγR activador" se refiere a un FcγR que es funcionalmente activo y capaz de proporcionar señalización estimuladora o positiva. También comprende las variantes "hiperactivas" o receptores mutantes que muestran una mayor actividad en comparación con sus homólogos normales, por ejemplo resultantes de un SNP. De forma similar, un "FcγR inhibidor" se refiere a un FcγR que es funcionalmente activo y capaz de proporcionar señalización inhibitoria o negativa.

Según la presente invención, un gen puede ser una secuencia genómica tal como una secuencia de ADNc. Una "muestra aislada de dicho individuo" puede ser cualquier tipo de muestra biológica o biopsia que comprende material celular, plasma, suero, orina, esputo, licor, etc. del individuo. Los ácidos nucleicos se pueden extraer mediante métodos conocidos en la técnica para obtener una muestra de ácido nucleico, por ejemplo, utilizando los kits de extracción de ADN o ARN comerciales.

La patente de EEUU 5.830.652 da a conocer la evaluación de la susceptibilidad relativa de un individuo a una enfermedad autoinmune mediante la detección del patrón alélico de un gen FCGR. Se dan a conocer sondas de oligonucleotidos específicas de alelo para la determinación del genotipo de los genes del grupo de genes FCGRII/III.

Kyogoku y otros (Arthritis Rheum. 2002; 46(5): 1242-54) dan a conocer un procedimiento para determinar la susceptibilidad genética para SLE mediante la caracterización de los SNP del gen receptor de Fcγ mediante la determinación del genotipo de los genes FCGR2B, FCGR2A, FCGR3A y FCGR3B. Jazwinska y otros (Clin Exp Immunol. 1991, 83(1); 47-51) analizaron la distribución de FCGR2 en SLE y escleroderma utilizando análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción. La distribución de FCGR2 en SLE y escleroderma no se diferenciaron de forma significativa de los controles.

Karassa y otros (Biomed Pharmacother, 2004; 58(5):286-91) dan a conocer que el polimorfismo de FCGR2 puede ser un factor de riesgo para SLE, síndrome antifosfolípidos (APS) y trombocitopenia inducida por heparina (HIT).

Su y otros (Genes Immun. 2002; 3 Suppl 1:551-8) dan a conocer un SNP en el gen FCGR2C que resulta en un codón de parada en el exón tres. Además, se da a conocer una frecuencia alélica mayor para FCGR2C-parada que para FCGR2C-ORF en la población humana. Los autores concluyen que no existe diferencia en la distribución FCGR2C-ORF/FCGR2C-parada en la población sana y en pacientes con SLE.

De Haas y otros (Blood. 1995; 86(6):2403-13) describen la determinación del genotipo para el polimorfismo NA del gen FCGR3B en individuos deficientes de FCGR3B utilizando un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa alineando un cebador específico de alelo y un ensayo de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción en base a transferencia Southern y delección adicional del gen FCGR2C. De Haas y otros investigaron la asociación de la deficiencia de FCGR2C y SLE. No sugirieron que la presencia de FCGR2C/ORF podría ser indicativa para ITP, KD o SLE.

Es conocido que los genes intactos *FCGR2A*, *FCGR2C* (por ejemplo, *FCGRRC-ORF*) *FCGR3A* y *FCGR3B* codifican receptores de FcγRII y FcγRIII activadores, mientras que *FCGR2B* codifica un FcγRIIb inhibidor. Sin querer estar unidos a ninguna teoría en particular, los presentes inventores han propuesto que un cambio en el equilibrio entre la cantidad o actividad de receptores de FcγRII y FcγRIII activadores por una parte y por otro lado del receptor de FcγRIIb inhibidor está asociado con la enfermedad autoinmune. Esto está en consonancia con la identificación de pacientes con la enfermedad autoinflamatoria de Kawasaki (KD) o ITP que tienen tres en vez de los dos alelos habituales del gen *FCGR3A* para el receptor de FcγRIIIa activador y el aumento de FCGR2C-ORF observado tanto en KD como en ITP.

En una realización preferente, un procedimiento según la presente invención comprende, por lo tanto, determinar la cantidad relativa de receptores de Fcγ activadores contra inhibidores y comparar la cantidad relativa encontrada en una población de control sana correspondiente. Un aumento en la proporción entre receptores activadores sobre inhibidores es un indicador de tener o desarrollar KD o ITP.

Será evidente para el experto en la materia que un procedimiento según la presente invención puede implicar la detección de diferentes genes activadores y/o inhibidores. En una realización, un procedimiento según la presente invención comprende determinar la cantidad del gen *FCGR2C* intacto, preferentemente *FCGR2C-ORF*. Debido a que *FCGR2C* no se expresa como un receptor activador funcional en la mayoría de una población sana que es homocigótica para el seudogén de *FCGR2C* debido al alelo de parada de *FCGR3C*, la presencia de un alelo de *FCGR2C-ORF* intacto desplazará el equilibrio hacia un exceso relativo de señales estimuladoras.

En un procedimiento según la presente invención la cantidad de gen FcγRII o FcγRIII activador y/o inhibidor se puede determinar en el nivel genómico y/o transcripcional, modificación propuesta por el solicitante el 13.4.11.

La determinación en el nivel genómico es preferente ya que los análisis genómicos habitualmente son rápidos, fiables y no requieren de personal altamente calificado. Por ejemplo, puede implicar la determinación de polimorfismos de número de copias del gen *FcγR* (CNP) y/o el análisis de alteraciones genómicas, por ejemplo, SNP, que afectan directa o indirectamente la transcripción génica o la función del producto génico.

Los procedimientos para detectar CNP son conocidos en la técnica. La mayoría de los procedimientos conocidos se basan en procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativos (Q-PCR). La reacción Q-PCR se caracteriza por un aumento exponencial en la cantidad de producto de PCR en los primeros ciclos, que llega a una fase de meseta ya que los productos de reacción se vuelven inhibidores. Cuanto mayor sea el número de copias inicial del gen diana, se detecta antes el aumento de la fluorescencia y se alcanza un valor menor del número de ciclos umbral (Ct). La posibilidad de la medición directa del producto de PCR acumulado después de cada ciclo de amplificación, sin etapas intermedias, asegura la alta especificidad de los ensayos Q-PCR. Actualmente existen cuatro tipos de sondas diferentes TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), Molecular Beacons, Scorpions®, sondas FRET y el colorante de unión a ADN SYBR® Green (Molecular Probes), se utilizan generalmente para Q-PCR. SYBR Green es un colorante fluorogénico que muestra poca fluorescencia en solución, pero emite una señal fluorescente fuerte tras la unión a ADN de doble cadena.

Gittinger y otros (Tissue Antigens. 2002; 60(1):64-70) describen la determinación del número de copias de *FCGR3B* correlacionando la cantidad de genes diana con la cantidad de un gen de referencia con una PCR cinética en tiempo real utilizando la técnica LightCycler.

Reilly y otros (Immunogenetics. 1994; 40:456) describen la determinación del número de copias de *FCGR2A*, *FCGR2B* y *FCGR2C* en individuos humanos utilizando la tecnología de transferencia Southern. Se identificó un individuo que carece de ambos genes *FCGR2C*.

El principio de diseño de sondas y la utilización en amplificación de la sonda dependiente de ligación múltiple (MLPA) se da a conocer en Schouten y otros (Nucleic Acids Res. 2002; 30(12):e57).

Los estudios que utilizan Q-PCR para detectar el número de copias de genes implican procedimientos relativamente cuantitativos que se basan en la detección de un gen de referencia para calcular el número de copias del gen, es decir, el gen de interés se normaliza a un gen endógeno adecuado ("housekeeping"). Hasta la fecha, el gen *ALB* que codifica la albúmina es generalmente utilizado para la comparación directa y la cuantificación como referencia estándar de oro. Por ejemplo, Thiel y otros (2002) utilizaron *ALB* como un gen de referencia interna para detectar el número de genes que codifican la proteína 22 de la mielina periférica (PMP22) en el cromosoma 17p11.2-12, cuyo gen es responsable de la neuropatía hereditaria de Charcot-Marie-Tooth (*CMT1A*). La misma estrategia con la albúmina como estándar interno fue aplicada por Schaeffeler y otros (2003) para determinar la dosis del gen *CYP2D6* por genoma para estudiar los fenotipos de metabolismo del fármaco. Ambos Thiel y Schaeffeler utilizaron la tecnología Taqman con sondas Taqman. Una estrategia similar con *ALB* como un gen de referencia se llevó a cabo por Layfield y otros (2003) utilizando la tecnología LightCycler con SYBR Green para cuantificar el número de copias de genes de receptor de EGF en adenocarcinoma colorrectal.

En todos estos estudios, el número de genes de albúmina se supone que es 2 en total - es decir, uno situado en el cromosoma materno número 4 y uno en el cromosoma paterno número 4 en cualquier individuo. Este supuesto ha sido aceptado como un "hecho" sin una verificación adecuada o prueba inequívoca. Sin embargo, los presentes inventores observaron que el número de copias de *ALB* varía considerablemente (2 o más) entre individuos humanos y, por lo tanto, no es tan estable como se esperaba. Parece que el gen *ALB* no podría ser utilizado como gen de referencia fiable en estudios de dosis génica. Por lo tanto, se propusieron identificar un gen de referencia que tiene una variación menor en el número de copias, en comparación con el "gen estándar de oro *ALB*" que codifica albúmina de suero humana, que puede servir como un gen de referencia más fiable en los estudios de dosis génica. Este objetivo se cumplió mediante la observación de que el gen *CYBB*, localizado en humanos en el cromosoma X, tiene una variación notablemente baja en el número de copias. Utilizando cebadores específicos para *CYBB* que hibridan en el exón 8 o alrededor del mismo del gen *CYBB*, los presentes inventores cribaron más de controles (hombres y mujeres), más de 200 portadores obligados (mujeres), más de 300 pacientes de sexo masculino y aproximadamente 30 fetos en un esfuerzo de diagnóstico prenatal de rutina. Este cribado no reveló ninguna variación en el número de copias de *CYBB*.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar el número de copias de los genes dianas *FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR2C*, *FCGR3A* y *FCGR3B*, u ortólogos de los mismos, en el genoma de un individuo, que comprende detectar la cantidad de dichos genes dianas en relación con la cantidad de un gen de referencia en una muestra de ácido nucleico de dicho individuo, en el que el gen de referencia es el gen *CYBB* o un ortólogo del mismo. Preferentemente, el individuo es un mamífero, más preferentemente un ser humano.

El gen *CYBB* (alias del gen son *CGD*; *NOX2*; *GP91-1*; *GP91PHOX*) fue identificado en Xp21. Éste codifica la proteína *CYBB*, también conocida como glicoproteína 91 (gp91)-phox, citocromo b₈₈₈ beta polipéptido, citocromo b₂₄₅ beta polipéptido. El citocromo b₈₈₈ se compone de la cadena alfa (*CYBA*) y beta (*CYBB*) del citocromo b₅₅₈. Se ha propuesto como un componente principal del sistema oxidasa microbicida de los fagocitos. La deficiencia de *CYBB*

es uno de los seis defectos bioquímicos descritos asociados con la enfermedad granulomatosa crónica (EGC).

El procedimiento preferentemente implica la detección de uno o más genes dianas y dicho gen *CYBB* utilizando la tecnología Q-PCR.

5 Otros procedimientos para el análisis cuantitativo de ácidos nucleicos también pueden ser utilizados, tales como transferencia Southern o amplificación de sonda dependiente de ligación múltiple (MLPA). El experto en la materia será capaz de diseñar conjuntos adecuados de cebadores de PCR para la detección del gen o genes dianas y el gen *CYBB*. En una realización, *CYBB* se detecta utilizando cebadores específicos de *CYBB* en el exón 8 o alrededor del mismo, ya que se encontró que con éste se obtenía alta eficiencia de la PCR. Sondas adecuadas para detectar productos de PCR amplificados incluyen SYBR Green I Dye, sondas de hidrólisis o sondas de hibridación. Las dos tecnologías de PCR cuantitativas más utilizadas son la tecnología Taqman® de Applied Biosystems y la tecnología LightCycler de Roche. En un aspecto, se emplea la tecnología LightCycler®. El sistema funciona con capilares de vidrio. Se puede aplicar aire caliente y frío, lo que permite una rampa rápida - 30 ciclos en 20 minutos. El proceso de PCR se controla mediante la cuantificación de la fluorescencia de los colorantes que se unen al ADN para la detección general de ADN de doble cadena, o con sondas de hibridación, para controlar la cantidad de una secuencia diana específica. Las sondas se irradian con un diodo que emite luz azul (470 nm), que excita colorantes amarillos incluyendo fluoresceína (FAM, FTTC) y SybrGreen. La luz fluorescente emitida es detectada en tres canales de luz verde (530 nm, fluoresceína), luz roja (640 nm, LightCycler® Red 640) e infrarrojo cercano (710 nm, LC Red 705).

25 En una realización preferente, el procedimiento de la presente invención comprende la determinación del número de copias de uno o más genes diana intactos del grupo de genes *FcγRII/FcγRIII* mediante PCR, utilizando una construcción de ácido nucleico recombinante ("construcción de referencia") que comprende un número conocido de copias de genes seleccionados del grupo que comprende *FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR2C*, *FCGR3A* y *FCGR3B* u ortólogos de los mismos, un fragmento o fragmentos de los mismos, así como un número conocido de copias del gen de referencia. Por lo tanto, la presente invención se refiere a una "construcción de referencia" de ácido nucleico recombinante que comprende dos segmentos, un primer segmento que comprende el gen de interés seleccionado del grupo que comprende *FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR2C*, *FCGR3A* y *FCGR3B* u ortólogos de los mismos, o un fragmento de los mismos, y un segundo segmento que comprende un gen de referencia, o un fragmento del mismo, preferentemente en el que la proporción entre dicho primer y dicho segundo fragmento es de 1:1.

35 La construcción de referencia, por ejemplo, es un plásmido o vector que comprende, como mínimo, dichos primer y segundo fragmentos. El primer segmento con la secuencia o secuencias del gen diana y el segundo segmento con la secuencia del gen de referencia se pueden ligar directamente sustancialmente el uno al otro, o pueden estar separados por un segmento de aminoácidos. El espacio entre los dos segmentos no es de particular relevancia, siempre y cuando ambos segmentos estén presentes en la misma construcción. El orden del primer y segundo segmentos dentro de la construcción es irrelevante. Por las razones mencionada anteriormente, una construcción de ácido nucleico tal como se ha descrito comprende como un gen de referencia el *CYBB* humano, o un ortólogo relevante del mismo en el caso en que se va a determinar el número de copias de un individuo no-humano. Los ortólogos del *CYBB* humano son conocidos en la técnica. En un aspecto específico, la construcción de referencia comprende, como mínimo, 50 pares de bases del *CYBB* humano. Se ha encontrado que la ligación de 198 pb del exón 8 del gen *CYBB* a un fragmento de un gen diana (por ejemplo, el gen *FCGR*, véase más adelante) dio muy buenos resultados.

45 De la comparación del gen de referencia (segmento) y el gen diana (segmento) en una proporción conocida (por ejemplo, 1:1), por un lado con el ADN diana que contiene un número de copias desconocido para estos genes, se puede calcular las diferencias exactas en la eficiencia de amplificación de la PCR y, por lo tanto, la proporción exacta de los genes a partir de la técnica LightCycler o Taqman. Una gran ventaja de utilizar una construcción de referencia para determinar el número de copias de un gen diana reside en el hecho de que la construcción externa que contiene tanto el gen diana como gen de referencia corrige en cada ciclo las diferencias en la eficiencia de amplificación de la PCR y la cantidad de genes provocadas por las variaciones en la cantidad de muestra inicial. Esta aplicación hace que el análisis de dosis génica sea robusto y fiable.

55 Se da a conocer un procedimiento para determinar si una persona está predispuesta para desarrollar KD o ITP tal como se describe a continuación, comprendiendo dicho procedimiento la determinación, preferentemente mediante Q-PCR, de la cantidad de los genes diana *FCGR2C*, *FCGR2B*, *FCGR2A*, *FCGR3A* y *FCGR3B* (u ortólogos de los mismos en caso que el procedimiento se aplique a individuos no humanos), y la presencia de un gen de referencia en una muestra de ácido nucleico de dicho individuo, en el que el gen de referencia es el gen *CYBB* utilizando como control externo una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende, como mínimo, un fragmento del gen diana y un fragmento del gen de referencia.

65 El experto en la materia entenderá que un procedimiento de detección de la presente invención que utiliza *CYBB* como gen de referencia y/o ADN de control recombinante no se limita con respecto a un gen diana en particular o grupo de genes diana a los que se les determinará el número de copias.

En una realización, un procedimiento de la presente invención implica el análisis de los SNP de una o más regiones, por ejemplo, la región del promotor, que controla la velocidad y la extensión de la transcripción del gen *FcγR*. Los polimorfismos en la región del promotor en el nucleótido -386 y -120 están vinculados a la actividad transcripcional del gen *FCGR2B* (Su y otros, *J Immunol.* 2004, 172:7186-91). Se han identificado cuatro haplotipos diferentes, es decir, 2B.1 o "tipo salvaje" (-386G/-120T); 2B.2 (-386C/-120T), que puede ser un polimorfismo más frecuente en el promotor del (pseudo)gen *FCGR2C*; 2B.3 (-386G/-120A) y 2B.4 (-386C/-120A). El haplotipo 2B.4 se describió que tiene una actividad transcripcional mejorada en comparación con el haplotipo 2B.1. Se encontró que las diferencias en las relaciones de ARNm de *FcγRIIa/FcγRIIb2* en neutrófilos (véase más adelante) estaban relacionadas con estos polimorfismos. Se encontró una fuerte asociación con el haplotipo 2B.4 y la relación de ARNm de *FcγRIIa/FcγRIIb2* 1:1, mientras que la relación de 2:1 estaba altamente asociada y las relaciones 3:1 y 4:1 de ARNm de *FcγRIIa/FcγRIIb2* incluso estrictamente asociadas con el haplotipo 2B.1 con actividad transcripcional baja. Estos resultados indican que el aumento de la transcripción de *FCGR2B* en neutrófilos está relacionada, modificación propuesta por el solicitante el 13.4.11, con el haplotipo 2B.4, lo cual resulta en proporciones de ARNm de *FcγRIIa/FcγRIIb2* más bajas. El hecho de que las células mononucleares de los mismos donantes muestran relaciones ampliamente variables y no fijas de ARNm de *FcγRIIa/FcγRIIb2* demuestra otros factores genéticos a ser identificados.

Un procedimiento de PCR de particular interés para la presente invención implica la tecnología de amplificación de la sonda dependiente de ligación múltiple (MLPA), originalmente descrita por Schouten y otros (*Nucleic Acids Res.* 2002; 30:e57). La MPLA es muy específica y requiere un mínimo de 20 ng de ADN genómico a analizar. Por ejemplo, se puede utilizar para la cuantificación relativa de 40 secuencias de ADN diferentes en una reacción fácil de llevar a cabo y utiliza más de un gen de referencia. Entre las aplicaciones conocidas de la técnica MLPA se incluyen la detección de deleciones y duplicaciones de exones en los oncogenes humanos, la detección de trisomías tales como el síndrome de Down, la caracterización de las aberraciones cromosómicas en líneas celulares y muestras de tumores, así como detección de SNP o mutaciones. La cuantificación relativa de ARNm mediante MLPA es otra aplicación que se ha descrito (Eldering y otros, 2003 *Nucleic Acids Res.* 2003; 31:e153).

En la MLPA, no son amplificados los ácidos nucleicos de la muestra sino las sondas que se añaden a las muestras mediante PCR y se cuantifican. La amplificación de las sondas depende de la presencia de secuencias diana de la sonda en la muestra. Cada conjunto de sondas comprende dos oligonucleótidos, dos sondas sintéticas o una sonda sintética y una sonda derivada de M13, que se hibridan a sitios adyacentes de la secuencia diana. Estas sondas hibridadas se ligan, lo que permite la amplificación posterior. Todas las sondas ligadas tienen secuencias finales idénticas que permiten la amplificación por PCR simultánea con la utilización de un par de cebadores universales. Al variar la longitud de la sonda para cada sonda, esto dará lugar a un producto de amplificación de tamaño único entre 130 y 480 pb. Las secuencias de las sondas diana son habitualmente pequeñas (de 50 a 100 nucleótidos). El requisito previo de una reacción de ligación ofrece la posibilidad de discriminar entre diferencias de nucleótidos individuales. El análisis de SNP se lleva a cabo de forma conveniente mediante la tecnología de MLPA utilizando sondas de MLPA específicas de la diana. Los presentes inventores diseñaron dos mezclas de sondas de MLPA nuevas para detectar secuencias específicas de *FCGR* dentro de los exones, intrones y regiones promotoras, así como para detectar los SNP específicos de *FCGR2B*, *FCGR2C*, *FCGR3A*, y *FCGR3B* (véanse figura 1 y tabla 2). Esto es un logro importante, ya que los genes *FCGR2A*, *FCGR2B* y *FCGR2C* muestran un grado extremadamente elevado de homología, al igual que los genes *FCGR3A*, y *FCGR3B*. Se da a conocer un procedimiento para la detección de CNP y/o SNP a nivel genómico mediante el análisis MLPA, en el que, como mínimo, se utiliza una de las sondas indicadas en negrita en la tabla 2A o 2B. Preferentemente, comprende la utilización de todas las sondas indicadas en negrita en la tabla 2A y/o 2B. Más preferentemente, comprende, en un tubo de reacción, la utilización de todas las sondas de la tabla 2A (mezcla de sondas 1) y en un tubo de reacción por separado, las sondas de la tabla 2B (mezcla de sondas 2). Las tablas 2C, 2D y 2E muestran las secuencias diana que son detectadas por las sondas de las tablas 2A y 2B, es decir, la secuencia de la sonda es complementaria a la secuencia diana. También se describe en el presente documento una sonda de MLPA que se utiliza de forma adecuada en un método de la presente invención, siendo seleccionada dicha sonda de las tablas 2C, 2D o 2E. En un aspecto específico, la presente invención se refiere a una sonda de *FCGR3* capaz de detectar una secuencia diana, tal como se muestra en la tabla 2D. También se describe una sonda de control que detecta una secuencia diana de la tabla 2E. Además, se describe la utilización, como mínimo, de una de las secuencias diana descritas en las tablas 2C, 2D y 2E en un procedimiento para determinar un CNP o un SNP en el grupo de genes *FcγRII/FcγRIII*.

Se pueden utilizar métodos analíticos de ácidos nucleicos (ADN) convencionales para detectar la cantidad de un gen *FcγRII* o *RIII* según la presente invención. Para una reseña sobre análisis cuantitativo de ácidos nucleicos, véase Ding y Cantor (2004), *J. Biochem. Mol. Biol.* Vol 37, No.1, págs. 1-10. El análisis por (Q-) PCR es particularmente conveniente para el propósito de la presente invención. Entre las técnicas de PCR preferentes se incluyen LightCycler y la tecnología MLPA.

Solo a modo de ilustración, el procedimiento de la presente invención se ejemplifica mediante el análisis del material obtenido de dos tipos de pacientes, que sufren cada uno de una enfermedad autoinmune diferente.

Un aspecto específico se refiere a un procedimiento para determinar si un individuo está predispuesto a desarrollar

ITP, que comprende determinar, en una muestra aislada de dicho individuo, la cantidad de genes, del grupo de genes FcγRII/FcγRIII, comprendiendo dicho grupo de genes FcγRII/FcγRIII los genes *FCGR2C*, *FCGR3A*, *FCGR2A* y *FCGR3B* que codifican un FcγR activador y *FCGR2B*, que codifica un FcγR inhibidor, en el que determinar la cantidad de dichos genes comprende, como mínimo, determinar la presencia del gen *FCGR2C-ORF*, además comprende opcionalmente detectar un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en un exón, intrón y/o región promotora, como mínimo, de un gen seleccionado del grupo que comprende *FCGR2C*, *FCGR2B*, *FCGR2A*, *FCGR3A* y *FCGR3B*, y correlacionar dicha cantidad con la cantidad observada en una población sana; en el que una cantidad aumentada de genes que codifican un FcγR activador y/o una cantidad disminuida de gen que codifica un FcγR inhibidor, es indicativa de que tiene una alta probabilidad de desarrollar ITP. Preferentemente, el procedimiento comprende detectar la cantidad del gen *FCGR2C-ORF*, determinar las frecuencias de alelos del SNP de *FCGR3A* para la variante o variantes FcγRIIIa-158F y/o FcγRIIIa-158V, y/o determinar la frecuencia de alelos para el polimorfismo promotor -386G/C.

Otros aspectos específicos se refieren a un procedimiento para determinar si un individuo está predispuesto a desarrollar la enfermedad de Kawasaki (KD), que comprende determinar en una muestra aislada de dicho individuo la cantidad de genes, del grupo de genes FcγRII/FcγRIII, comprendiendo dicho grupo de genes FcγRII/FcγRIII los genes *FCGR2C*, *FCGR3A*, *FCGR2A* y *FCGR3B* que codifican un FcγR activador y *FCGR2B*, que codifica un FcγR inhibidor, en el que determinar la cantidad de dichos genes comprende, como mínimo, determinar la presencia del gen *FCGR2C-ORF*, además comprende opcionalmente detectar un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en un exón, intrón y/o región promotora, como mínimo, de un gen del grupo que comprende *FCGR2C*, *FCGR2B*, *FCGR2A*, *FCGR3A* y *FCGR3B*, y correlacionar dicha cantidad con la cantidad observada en una población sana; en el que una cantidad aumentada de genes que codifican un FcγR activador y/o una cantidad disminuida de gen que codifica un FcγR inhibidor, es indicativa de que tiene una alta probabilidad de desarrollar KD.

Nunca se había observado variación en la unión de la sonda al exón 8 de *FCGR2B* en controles sanos o miembros de varias familias multigeneracionales para determinar los patrones de herencia en el grupo de genes *FCGR*. Preferentemente, el procedimiento comprende detectar la cantidad de *FCGR2B*, por ejemplo, mediante la detección de pérdida o ganancia de producto de amplificación del exón 3 de *FCGR2B*, del gen *FCGR2C-ORF* y/o de la cantidad de *FCGR3A* (por ejemplo, mediante análisis de CNP). Más preferentemente, un procedimiento para determinar la predisposición para KD comprende, como mínimo, determinar la presencia de la unión de la sonda del exón 8 de *FCGR2B* y del gen *FCGR2C-ORF*.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Los receptores Fc son proteínas en la superficie de todos los leucocitos y plaquetas que son capaces de unirse a inmunoglobulinas, especialmente cuando éstas se encuentran en forma de complejo con antígenos en un complejo inmunitario. Los receptores Fc-gamma (FcγR) se unen específicamente a la inmunoglobulina G (IgG). FcγR existe en un número de isoformas, a saber, FcγR de tipo I, tipo II y tipo III. FcγRI es un receptor con una alta afinidad por IgG, mientras que FcγRII y FcγRIII tienen una menor afinidad. La distribución de estos receptores sobre los distintos tipos de leucocitos se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Diversidad de FcγR y distribución celular

Subclase	Genes	Distribución celular	Motivo
FcγRI	<i>FCGR1</i>	monocitos, macrófagos, neutrófilos tratados con IFNγ o G(M)-CSF	ITAM en cadenas γ
FcγRIIa	<i>FCGR2A</i>	monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos B y plaquetas	ITAM en FcγR
FcγRIIb	<i>FCGR2B</i>	linfocitos B (macrófagos, neutrófilos)	ITAM en FcγR
FcγRIIc	<i>FCGR2C</i>	???	ITAM en FcγR
FcγRIIIa	<i>FCGR3A</i>	células NK, macrófagos	ITAM en cadenas γ
FcγRIIIb	<i>FCGR3B</i>	neutrófilos, eosinófilos tratados con IFNγ	ITAM en cadenas γ

La unión de IgG (en un complejo) a los FcγR, en general, induce la activación celular, tal como, por ejemplo, la absorción de los complejos inmunes, liberación de proteínas citotóxicas y la generación de especies de oxígeno reactivo por los leucocitos fagocíticos (neutrófilos, eosinófilos y monocitos/macrófagos). También la producción de inmunoglobulinas, la producción de citoquinas y las reacciones citotóxicas de subpoblaciones específicas de linfocitos son inducidas por los receptores Fcγ. Esta activación de las células está mediada por un denominado motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM), ubicado en la cola citoplasmática del propio FcγR o en regiones citoplásmicas de proteínas asociadas, que se vuelve fosforilada después de la reticulación de FcγR en la superficie celular por el complejo inmune. Sin embargo, también hay un FcγR que inhibe la respuesta inmune. Este FcγRIIb contiene un motivo ITIM inhibidor en su cola citoplasmática, que se asocia con tirosina fosfatasas que contrarrestan la fosforilación del motivo ITAM. Por lo tanto, una respuesta inmune equilibrada está mediada por un equilibrio entre las señales de los FcγR activadores y el FcγRIIb inhibidor.

Recientemente, ha quedado clara la importancia del FcγRIIb inhibidor a partir de estudios con ratones “knock-out”.

- Estos ratones, que carecen de FcγRIIb, fueron sometidos a un tratamiento que induce reacciones inflamatorias en la piel, pulmones, articulaciones o riñón. Resultó que los ratones “knock-out” desarrollaron excesivas reacciones inflamatorias autoinmunes y crónicas, lo que demuestra claramente que la inhibición de la respuesta inmune mediante señales de FcγRIIb es indispensable para una reacción fisiológica normal a un reto antigénico (Clynes y otros. J. Exp. Med. 1999; 189:179; Yuasa y otros, J. Exp. Med. 1999, 189:187; Bolland y Ravetch, Immunity 2000; 13: 277). Por esa razón, han sido investigados pacientes con la enfermedad autoinmune SLE para determinar la presencia de SNP en su gen de FcγRIIb *FCGR2B*. Sin embargo, hasta ahora, no se ha encontrado una correlación evidente entre la presencia de ciertos polimorfismos y la susceptibilidad a esta enfermedad.
- La citobanda 1q21-23 es una de las regiones implicadas en la susceptibilidad a múltiples enfermedades autoinmunes. Los genes FcγRII/III se encuentran en 1q23, y una nueva familia de genes, genes similares al receptor de Fc (*FCRL*, también conocidos como FcRHs), se agrupan próximos a 1q21 (Davis y otros, 2001, 2002). Los FCRL tienen una alta homología estructural con los genes clásicos que codifican los FcγR, aunque los ligandos y la función de las proteínas similares a FcR aún no se conocen. La región 1q23 es un locus candidato para la susceptibilidad a SLE y las variantes en los genes FcγRII/III clásicos explican parcialmente la susceptibilidad a enfermedades (Tsao, 2003; Ravetch y Bolland, 2001;. Kyogoku y otros, 2002). Aunque 1q21-23 es una buena región candidata para contener genes de susceptibilidad a artritis reumatoide, la asociación de los FcγR clásicos con susceptibilidad a enfermedades sigue siendo controvertida (Nieto y otros, 2001;. Radstake y otros, 2003).
- Los presentes inventores estudiaron los genes en el grupo FcγR y los cambios en los mismos en detalle en la enfermedad de Kawasaki, una enfermedad autoinflamatoria importante y en ITP, una enfermedad hematológica autoinmune.
- La enfermedad de Kawasaki es un síndrome febril agudo en la infancia, que se caracteriza por una vasculitis de las arterias, principalmente de tamaño mediano. Puesto que no hay pruebas específicas para diagnosticar la enfermedad, el diagnóstico se hace sobre criterios clínicos. En primer lugar, la fiebre debe estar presente durante más de cinco días, sin responder a antibióticos o antipiréticos. Además, como mínimo, deben estar presentes cuatro de los cinco síntomas siguientes: linfadenopatía, edema y eritema de manos y pies, una erupción polimorfa, conjuntivitis bilateral, enanema e inflamación de las membranas mucosas (Kawasaki, 1979, Burns y Glode, 2004). La incidencia de la enfermedad de Kawasaki es de 5-17 por 100 000 en Europa y Estados Unidos, sobre todo en niños menores de cinco años. Por razones desconocidas la incidencia en Japón es de 135 por 100 000. En aproximadamente un 25% de los niños la vasculitis conducirá a lesiones aneurismáticas coronarias (CAL) detectadas por ecocardiografía, que puede aparecer durante la fase aguda de la enfermedad cuando no ha sido tratada. Esto hace que sea la principal causa de cardiopatía adquirida en niños. La vasculitis coronaria puede causar la muerte por ruptura repentina al convertirse el diámetro en gigante, o causar una perturbación del flujo y trombosis en las lesiones aneurismáticas, lo que resulta en infarto agudo de miocardio. Después de la recuperación, la enfermedad de Kawasaki puede conducir finalmente a enfermedades del corazón en la adolescencia o en la adultez temprana debido a estenosis progresiva y calcificación de las arterias coronarias afectadas.
- El tratamiento consiste en una sola dosis elevada de inmunoglobulina intravenosa (IVIg) (2 g/kg) en infusión de 8-12 horas y aspirina, lo que resulta en una disminución de las complicaciones de un 5-16% (Newburger y otros, 1991, Tse y otros, 2002). Hasta la fecha, se conoce poco sobre los mecanismos de funcionamiento de la IVIg y por qué esta terapia tiene éxito en muchos y falla en otros pacientes con la enfermedad de Kawasaki, especialmente en los más jóvenes. El manejo inadecuado o eliminación insuficiente de antígenos microbianos mediante los mecanismos dependientes de IgG, en algunas personas, puede ser responsable de esta diferencia.
- Los pacientes con ITP sufren de una tendencia al sangrado. El bajo número de plaquetas en la circulación de estos pacientes es causada por la presencia de auto-anticuerpos contra las plaquetas. La terapia estándar es, de nuevo, la IVIg o corticosteroides.
- El lupus eritematoso sistémico (SLE) es la enfermedad autoinmune arquetípica, dadas sus complejas manifestaciones clínicas y moleculares. Al igual que otras enfermedades reumáticas, un manejo adecuado depende de forma crítica de la correcta evaluación de la actividad de la enfermedad, daño de órganos y la calidad de vida. Los pacientes con SLE sufren de una enfermedad autoinmune caracterizada por la producción de autoanticuerpos antinucleares causados por un fallo de la tolerancia de las células B y deposición en el tejido de complejos inmunes. De esta manera, los linfocitos B juegan un papel clave en la patogénesis de SLE por mecanismos dependientes de autoanticuerpos e independientes de autoanticuerpos. Además, las interacciones aberrantes entre células B y T son críticas para la aparición y progresión de la enfermedad. Entre los nuevos agentes que directamente fijan como diana las células inmunes anormales en SLE se incluyen anticuerpos de depleción o modulación de células B, rituximab (anti-CD20) y epratuzumab (anti-CD22) y el tolerógeno anti-ADNs LJP394. Las células del sistema inmune también se pueden manipular de forma indirecta a través de los efectos de las citoquinas. Para las células B, anti-BAFF (factor de activación de células B de la familia de necrosis tumoral) proporciona un ejemplo de esta estrategia. Otras citoquinas más pleiotrópicas también pueden ser bloqueadas en SLE. Además del bloqueo de la interleuquina-10 (IL-10), la primera estrategia anti-citoquinas examinada, se trata principalmente que se ha centrado la atención en la terapia anti-TNF, siendo una promesa para algunos pacientes con nefritis lúpica. Muchas otras

citoquinas, tales como IL-6, IL-18, y los interferones de tipo I, representan interesantes dianas de futuro en las que el antagonismo depende de las propiedades de neutralización, así como de los efectos mediados por Fc γ R.

5 La artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, las espondiloartropatías seronegativas que incluyen artritis psoriásica y SLE, son todas ejemplos de enfermedades reumáticas en las que la inflamación está asociada con la patología esquelética. Aunque algunos de los mecanismos de remodelación esquelética son comunes entre estas enfermedades, cada enfermedad tiene un impacto singular sobre el hueso articular o en el esqueleto axial o apendicular. El bloqueo de TNF por los denominados biológicos (anticuerpos monoclonales murinos humanizados anti-TNF o moléculas quiméricas diseñadas como dominios de unión al extremo N-terminal derivados de receptores auténticos y cola Fc de unión a Fc γ R del extremo C-terminal) con fuertes propiedades de unión a TNF han impactado de forma significativa en la terapia de una serie de enfermedades autoinmunes crónicas, tales como las enfermedades reumáticas mencionadas anteriormente, así como la enfermedad inflamatoria intestinal. La experiencia con esta terapia en artritis reumatoide (AR) y enfermedad de Crohn (CD) ha extendido su aplicación a otras enfermedades autoinmunes y ha conducido a beneficios terapéuticos aumentados. Otra estrategia prometedora ha sido bloquear las interacciones coestimuladoras entre las células T y B en enfermedades reumáticas, por ejemplo, mediante la inhibición de la vía de unión CD40-CD40 con anticuerpo monoclonal anti-unión CD40 o de la vía de B7 con la quimera CTLA4-Ig. Aún existen muchas limitaciones, pero las perspectivas para el futuro de dichos productos biológicos es interesante. Las propiedades de unión a Fc γ de estos productos biológicos hace que la eficacia terapéutica esté sujeta a la misma influencia de los Fc γ R tal como se ha demostrado en el caso de la inmunoglobulina intravenosa a través de actividades mediadas por Fc γ R.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

25 Figura 1: Localización de las sondas de MLPA en el grupo de genes *FCGR2* (panel A) y en el grupo de genes *FCGR3* (Panel B). Se pueden utilizar varias sondas en cada gen por separado para determinar los CNP y los SNP. Nótese que la sonda que reconoce *FCGR3B-NA1* es la misma que reconoce *FCGR3A*.

Figura 2. Distribución de las relaciones de ARNm de Fc γ RIIa y Fc γ RIIb en cincuenta individuos caucásicos sanos.

30 Figura 3: Expresión y función.

- A. Distribución de la expresión de ARNm de Fc γ RIIc en leucocitos.
- B. La expresión de Fc γ RII en células NK está limitada al genotipo *FCGR2C-ORF*. Las células de la sangre se incubaron con CD56 y CD32. Los linfocitos fueron separados en base a su patrón de dispersión frontal / dispersión lateral. La población de células NK se determinó como los linfocitos positivos a CD56.
- C. La expresión de Fc γ RIIc en células NK está modulada por IL-15 pero no por IL-12. Los PBMC fueron aislados y cultivados. La expresión en células NK CD56+ se midió mediante citometría de flujo con CD32 en los tiempos indicados. Hubo una expresión significativamente mayor en el día 2 y 5 de las células NK estimuladas con IL-15 ($p=0,01$, $n=5$).
- D. El ARNm de Fc γ RIIc está fuertemente regulado de forma creciente por GM-CSF en células de donadores de *FCGR2C-ORF*. Se aislaron neutrófilos y PBMC y se cultivaron durante 4 horas con el estímulo indicado. El ARNm de Fc γ RIIc se midió mediante RT-PCR cuantitativa. GM-CSF regula fuertemente de forma creciente el ARNm de Fc γ RIIc en neutrófilos y en menor medida en PBMC de donadores con el genotipo *FCGR2C-ORF*, pero no en donadores *FCGR2C-parada* ($p=0,0001$ y $p=0,01$, respectivamente; $n=5-8$).
- E. ADCCr. Se aislaron PBL y la funcionalidad de Fc γ RIIc se evaluó mediante ADCCr. Células de donadores con el genotipo *FCGR2C-parada* y *FCGR2C-ORF* destruyeron dianas recubiertas con anti-Fc γ RII con cinéticas similares (paneles superior izquierda e inferior izquierda, respectivamente). Por el contrario, solamente las células de donadores con el genotipo *FCGR2C-ORF* fueron capaces de destruir dianas recubiertas con anti-Fc γ RII (panel inferior derecha)($n=4$).
- F. ADCCr con células estimuladas. Se obtuvieron PBL y posteriormente se cultivaron durante 2 días con o sin IL-2 o IL-15. A continuación, las células se recogieron y se utilizaron en un ADCCr. Células de donadores con el genotipo *FCGR2C-parada* y *FCGR2C-ORF* destruyeron dianas recubiertas con anti-Fc γ RIII (panel a la izquierda). En ambos casos, IL-15, y en menor medida IL-2, mejoraron la lisis específica de las dianas recubiertas con anti-Fc γ RIII ($n=3$). Por el contrario, solamente las células de donadores con el genotipo *FCGR2C-ORF* fueron capaces de destruir dianas recubiertas con anti-Fc γ RII (panel a la derecha). En este caso, nuevamente IL-15 mejoró notablemente la lisis celular específica ($n=3$).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Validación del gen *CYBB* como gen de referencia

5 *Secuencias de cebadores:*

Albúmina	Cebador Alb-F:	5'-TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT-3'
	Cebador Alb-R:	5'-CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT-3'
<i>FCGR2B</i>	FCGR2Bex3-(Eco I)-F:	5'-CTCTCAAGCTCCTTGGGCTTCTCTTCT-3'
	FCGR2Bex3-(Not I)-R:	5'-ACCCCCCTTCTGCAAACCTCTGC-3'
Crom. Y	SRY 109F:	5'-TGGCGATTAAGTCAAATTCGC-3'
	SRY 245R:	5'-CCCCCTAGTACCCTGACAATGTATT-3'
<i>CYBB</i>	CYBBex8-(HindIII)-F:	5'-GAGATCAAGCTTATGTCAAATATTTAAGCAAGCCTAC-3'
	CYBBex8-(Xho I)-R:	5'-GAGATCCTCGAGACTTGTCCATGATATAGTTAGACAC-3'

Construcción FCGR2B/ALB

10 Para cuantificar el número de copias *FCGR2B* con RT-PCR cuantitativa, se preparó una construcción que contiene un fragmento de 80 pb del gen *ALB* y un fragmento de 400 bp de *FCGR2B* por BaseClear Labservices BV. Para el protocolo detallado nos referimos a BaseClear Labservices B.V, código de proyecto 11926.

15 En resumen, se llevó a cabo una PCR en una muestra de ADN humano para obtener un producto de PCR del fragmento de gen *ALB* utilizando los cebadores Alb-F y Alb-R y el par de cebadores *FCGR2B*-ex3-F y *FCGR2B*-ex3-R para obtener el fragmento del exón 3 de *FCGR2B*. Los productos de PCR se hicieron romos y se fosforilaron (uno de los productos). Los productos se ligaron durante toda la noche y se llevó a cabo una PCR (en el producto de la ligación) con el fin de amplificar el fragmento total de 480 bp. Los productos de PCR se clonaron en un vector pGEMT-easy, los clones fueron recogidos y secuenciados para confirmar la secuencia.

20

Construcción FCGR2B/CYBB

25 Debido a que se observó una variación en el número de copias del gen *ALB*, se preparó una nueva construcción con *CYBB* como gen de referencia/calibrador. La construcción se basa en un plásmido que contiene un fragmento de 217 pb del gen *CYBB* y el fragmento de 400 pb del gen *FCGR2B*. Para esta construcción, se utilizó un fagémido Bluescript SK +/- . Utilizando un protocolo estándar de clonación, el fragmento *CYBB* se clonó en el fagémido SK Bluescript +/- utilizando las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI*. Los clones fueron recogidos y secuenciados para confirmar la secuencia de *CYBB* insertada. Posteriormente, se clonó el fragmento de *FCGR2B* utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI*. Una vez más, los clones se secuenciaron para confirmar las secuencias insertadas. El plásmido se hizo lineal con la enzima de restricción *ScaI*. La construcción que contiene el fragmento *CYBB* también se puede utilizar en combinación con otros genes diana o fragmentos de los mismos (por ejemplo, *FCGR2A*, *FCGR2C*).

30

PCR cuantitativa en tiempo real

35

La amplificación mediante PCR se llevó a cabo en un instrumento LightCycler (Roche, Almere, Países Bajos), con la versión de software 3.5. La reacción se llevó a cabo con LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche). La temperatura de alineación de los cebadores *ALB* y *FCGR2B* fue de 65°C, para los cebadores *CYBB* fue de 60°C. La mezcla de reacción consistió en 4 µl del plásmido o 4 µl (100 ng) de ADN genómico, 1 µl del cebador directo y 1 µl del cebador inverso (1 µM), 4 µl de la mezcla LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche) y 10 µl de agua. La PCR comienza con una etapa de incubación previa durante 10 minutos a 95°C seguida de 40 ciclos de desnaturalización de 5 s a 95°C, alineamiento de los cebadores a 60°C o 65°C dependiendo de los cebadores utilizados durante 30 s, seguido de extensión a 72°C durante 15 s. Al final de 40 ciclos, se generó una curva de fusión para determinar la especificidad de los productos amplificados. Una serie de diluciones en serie de 10 veces de la construcción que contiene *FCGR2B/ALB* o la construcción que contiene *FCGR2B/CYBB* (1:1) se utilizó para construir una curva estándar con la que se cuantificó cada muestra. Se utilizaron los valores del ciclo umbral (Ct) de las muestras de la construcción diluidas en serie, determinados por el "método del máximo de la segunda derivada", para calcular y trazar una curva de regresión lineal, tal como la realizada por el software. A partir de esta regresión, se puede evaluar la calidad de la curva estándar mediante la pendiente y el coeficiente de correlación (r). La pendiente de la curva se utilizó para calcular la eficiencia de la reacción de la PCR (E). La E de las diferentes combinaciones de cebadores de la PCR no difirieron en más de 0,05. Los 4 puntos de la curva estándar se asignaron cantidades sin dimensiones 1.000, 100, 10 y 1, respectivamente. Posteriormente, el software puede asignar una cantidad sin dimensiones a las muestras no conocidas en función de su valor Ct observado. Las muestras no conocidas se evaluaron por duplicado. Para cada muestra el valor calculado de *FCGR2B*, en dependencia del valor de Ct, se dividió por el valor calculado para el gen de referencia/calibrador utilizado en el

55

ensayo (ya sea albúmina o *CYBB*).

Cuando se utilizó la construcción *FCGR2B/ALB* para la curva estándar, un resultado observado de una muestra no conocida (cantidad de *FCGR2B*/cantidad de *ALB*) de 1 significa que el individuo porta la misma cantidad de número de copias de *FCGR2B* en comparación con *ALB* (hasta ahora se cree generalmente que son dos copias). Como *CYBB* es un gen unido al cromosoma X, cuando se utiliza la construcción *FCGR2B/CYBB*, la interpretación del resultado depende de si el ADN analizado es masculino o femenino.

Resultados

De los primeros resultados obtenidos con la construcción *FCGR2B/ALB* se hizo evidente que el gen *ALB* no es un buen gen de referencia. Los valores observados de los resultados de las muestras no conocidas, por ejemplo, de 0,25 implicaría un número de copias de 0,5 de *FCGR2B*. Los presentes inventores han planteado la hipótesis de que este resultado sólo puede ser observado cuando un individuo porta una copia de *FCGR2B* y 4 copias del gen que codifica la albúmina, o dos copias de *FCGR2B* y 8 copias de *ALB*. Para probar esta hipótesis se llevó a cabo una RT-PCR cuantitativa con cebadores específicos para el cromosoma Y y el gen *ALB*. Se utilizó una serie de diluciones de 10 veces de ADN de un hombre para construir una curva estándar. Para un hombre, el resultado esperado sería 1 (cantidad de productos del cromosoma Y/cantidad de productos de *ALB*, tal como es comparable con la curva estándar utilizada). Sin embargo, para la muestra mencionada anteriormente se observó un resultado de 0,5. Los presentes inventores llegaron a la conclusión de que esto sólo puede explicarse para 4 copias del gen de la albúmina. Para probar esta hipótesis aún más, también se llevó a cabo una PCR cuantitativa con cebadores específicos de *CYBB* y *ALB*. Una vez más, se utilizaron diluciones en serie de 10 veces de un hombre para construir la curva estándar. El resultado de este ensayo confirmó los resultados anteriores observados. Por lo tanto, la construcción que contiene *FCGR2B/ALB* no se utilizó más y se desarrolló una nueva construcción que contiene *FCGR2B/CYBB*. La construcción que contiene *CYBB* como un gen de referencia/calibrador también se utilizó para preparar las siguientes construcciones: *FCGR2A/CYBB*, *FCGR2C/CYBB*.

Ejemplo 2: Determinación del número de copias en pacientes con enfermedades autoinmunes utilizando la tecnología LightCycler

Utilizando el procedimiento descrito en el ejemplo 1, se analizaron 40 pacientes con la enfermedad de Kawasaki (KD) y 40 controles sanos emparejados por edad. En 17 pacientes con KD se observó una pérdida del número de copias de *FCGR2B*, mientras que esto sólo se observó en 8 controles ($p < 0,05$).

Ejemplo 3: PCR de transcriptasa inversa cuantitativa para la cuantificación de los transcritos

Se aisló ARNm a partir de 10^7 neutrófilos purificados y se transcribieron de forma inversa en ADNc. Se diseñaron cebadores que contenían intrones para amplificar de forma específica el cDNA y excluir la amplificación de ADN genómico, obteniendo productos de 100 pb para β -glucuronidasa (*GUS*), 244 pb para *Fc γ RIIa* y 243 pb para *Fc γ RIIb2*.

Secuencias de cebadores:

β -Glucuronidasa (<i>GUS</i>)	cebador directo:	5'-GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT-3'
	cebador inverso:	5'-CCGAGTGAAGATCCCCCTTTT-3'
<i>FcγRIIa</i>	cebador directo:	5'-ATCATTGTGGCTGTGGTCATTGC-3'
	cebador inverso:	5'-TCAGGTAGATGTTTTTATCATCG-3'
<i>FcγRIIb2</i>	cebador directo:	5'-GGAAAAGCGCATTTGAGCCAATC-3'
	cebador inverso:	5'-GGAAATACGAGATCTTCCCTCTCTG-3'

Reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación mediante PCR se llevó a cabo en un instrumento LightCycler (Roche, Almere, Países Bajos), con la versión de software 3.5. La reacción se llevó a cabo con LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche), que ha sido optimizado por el fabricante de manera que ya no es necesaria la optimización de $MgCl_2$. La temperatura de alineación utilizada para todos los cebadores fue de 60°C. La mezcla de reacción consistió en 2 μ l de ADNc, 1 μ M de cada combinación de cebadores y 4 μ l de la mezcla LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche) en un total de 20 μ l. Todos los ADNc amplificados se compararon con el estándar dentro del mismo ciclo experimental y en cada ciclo experimental se utilizó el mismo estándar, aunque hubo muy poca variación en los estándares entre los ciclos experimentales. Para la amplificación, se utilizó el siguiente protocolo de LightCycler. Se eliminó la hendidura química de la Taq polimerasa mediante incubación previa durante 10 minutos a 95°C para activar la Taq polimerasa; la plantilla se amplificó durante 40 ciclos de desnaturalización de 5 segundos a 95°C, alineación de los cebadores a 60°C durante 30 segundos, seguido por la extensión a 72°C durante 15 segundos. La cantidad de fluorescencia se midió al final de cada ciclo a 72°C. Al final de los 40 ciclos, se generó una curva de fusión para determinar las características únicas del ADN amplificado. Para identificar el producto obtenido, se

sometió a un gel de agarosa al 1% p/v, para determinar el tamaño. Posteriormente, la banda obtenida se purificó mediante GFX PCR DNA y el kit de purificación Gel Band (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante para eliminar el exceso de los dNTP y los cebadores. El producto se secuenció mediante Big-Dye Terminator Cycle Sequencing (versión 1.1) y el programa ABI Prism (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). La secuencia obtenida se verificó con BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para determinar la especificidad. Todos los productos obtenidos eran únicos y no se superponían con otras isoformas.

Curvas estándar y de cuantificación relativa

Como una fuente de ADNc para las curvas estándar con las que se normalizaron todas las muestras, se aislaron neutrófilos a partir de una capa de aféresis leucocitaria obtenida del banco de sangre North-West (Sanquin). Se llevaron a cabo diluciones en serie de 10 veces a partir del ADNc obtenido con las que se cuantificó cada muestra con el procedimiento descrito en la Nota Técnica No. LC 13/2001 (Roche Applied Science). En resumen, se utilizaron los valores del ciclo umbral (C_T), determinados mediante el programa LightCycler, para calcular y trazar una curva de regresión lineal, tal como la realizada por el programa. A partir de esta regresión, se puede evaluar la calidad de la curva estándar por la pendiente y el coeficiente de correlación (r). La pendiente de la línea se utilizó para determinar la eficiencia de la reacción (E). A partir de los C_T y las eficiencias obtenidas, se puede calcular la relación normalizada con la siguiente fórmula: $E_T^{C_{pT}(C)-C_{pT}(S)} : E_R^{C_{pR}(C)-C_{pR}(S)}$, en la que E_T es la eficiencia de la PCR del gen diana, E_R la eficiencia de la PCR del gen de referencia, $C_{pT}(C)$ es la C_T medida del gen diana determinada por el estándar o calibrador, $C_{pT}(S)$ es la C_T medida del gen diana determinada para la muestra, $C_{pR}(C)$ es la C_T medida del gen de referencia del calibrador o estándar, y la $C_{pR}(S)$ es la C_T medida del gen de referencia de la muestra.

Validación de la RT-PCR cuantitativa para las isoformas FcγRII en el LightCycler

Para estudiar los niveles de expresión de las isoformas de FcγRII en neutrófilos, se llevó a cabo una RT-PCR cuantitativa relativa mediante el instrumento LightCycler. Esta técnica dio lugar a un procedimiento altamente sensible y específico para determinar los niveles de expresión de ARNm de FcγRIIa y FcγRIIb2 en neutrófilos. Las pendientes de los estándar para cada reacción de PCR fueron de aproximadamente -3,3, dando una eficiencia de aproximadamente 2, lo que indica que durante cada ciclo se duplicó el producto específico. Además, cada conjunto de cebadores utilizados dio lugar a una curva de fusión específica con su propia temperatura de fusión (T_m), mientras que los controles que no eran plantillas mostraron una curva de fusión diferente o ningún producto en absoluto. La figura 2 muestra que se encontraron relaciones de ARNm de neutrófilos distintas para FcγRIIa:FcγRIIb en una población caucásica normal.

Ejemplo 4: ensayo MLPA con sondas de nuevo desarrollo

Se aisló ADN, ya sea con el kit de aislamiento de ADN Puregene (Biozym, Hess, Oldendorf, Alemania) o el kit QIAamp DNA Blood (Qiagen, Hilden, Alemania). Para analizar el grupo de genes FCGR se utilizó un ensayo de Amplificación de Sonda por Ligación Múltiple. Se diseñaron nuevas sondas que son altamente específicas para los genes FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C, FCGR3A y FCGR3B. Como el grupo de genes FCGR es muy homólogo, esto no fue posible para todos los sitios. Como mínimo, se diseñaron 3 sondas por gen para cubrir cada gen individual. De esta manera, se pueden estudiar los CNP y las inserciones/delecciones parciales. Se diseñaron sondas por separado para estudiar los SNP conocidos (funcionales) en FCGR2A (131 H/R), FCGR2B (232 I/T), promotor de FCGR2B y C (-386, -120), FCGR3A (NA1 /NA2 /SH) y FCGR3B (158 V/F). Para una descripción de la ubicación y las secuencias diana específicas de las sondas véanse las figuras 1A y 1B y la tabla 2 más adelante. Las sondas se prepararon según Schouten y otros, 2002. Debido a la homología entre ciertas sondas, las sondas tienen que ser divididas en dos mezclas independientes (sonda MIX 1 y sonda MIX 2, véanse las tablas 2A y 2B, respectivamente) para evitar la competencia.

Tabla 2A: "Sonda MIX 1". Las sondas en negrita indican aquellas que se requieren para una respuesta fiable del ensayo. Las secuencias diana de las sondas se muestran en las tablas 2C, D y E.

Longitud	Sonda #	Posición gen/crom.	Comentarios
130	0797-L0463	Crom. control 5q31	
136	2271-L2327	Sonda de control, Crom. 1p36	
142	3605-L2972	FCGR2A, exón 1 (D01A)	
148	3610-L2977	FCGR2C, exón 7 (D07)	
154	2679-L2144	Sonda de control, Crom. 1q25	
160	3616-L2983	FCGR3A, exón 3 (D03)	SNP detecta la variante NA1 y FCGR3A
172	2677-L2143	Sonda de control, Crom. 1q25	
181	3611-L2978	FCGR2B, exón 1 (D01A)	Detecta también FCGR2C
193	3606-L2973	FCGR2A, exón 1 (D01B)	
202	4812-L4198	FCGR2B, 232I/T (D05B)	SNP detecta la variante 232-I frecuente
211	3609-L2976	FCGR2C, exón 6 (D06)	

Longitud	Sonda #	Posición gen/crom.	Comentarios
220	3619-L2986	FCGR2B, intrón 3 (D03)	En la frontera intrón/exón del exón 4
229	1487-L1095	Sonda de control, Crom. 16q24	
238	0974-L0561	Sonda de control, Crom. 14q12	
265	1325-L0874	Sonda de control, Crom. 17p13	
274	3613-L2980	FCGR2B, exón 6 (D06A)	
283	3608-L2975	FCGR2A, exón 5 (D05A)	
292	3162-L2603	Sonda de control, Crom. 11p11	
301	1916-L1460	Sonda de control, Crom. 1q21	
310	3618-L2985	FCGR3B, exón 5 (D05)	
319	3612-L2979	FCGR2B, exón 7 (D07A)	
328	1918-L1462	Sonda de control, Crom. 1q21	
337	3614-L2981	FCGR3A, exón 1 (D01)	
346	3615-L2982	FCGR3B, exón 1 (D01)	
355	4813-L4187	FCGR2A, 131H/R (D04A)	SNP detecta la variante 131-H
373	2560-L2023	Sonda de control, Crom. 3q23	
382	2908-L2302	Sonda de control, Crom. Xq23	
391	4816-L4190	FCGR3A, 158V/ F (D04)	SNP detecta la variante 158-F
400	4818-L4192	FCGR2C, 2C-parada-especifico	

Tabla 2B: "Sonda MIX 2". Las sondas en negrita indican aquellas que se requieren para una respuesta fiable del ensayo. Las secuencias diana de las sondas se muestran en las tablas 2C, D y E.

Longitud	Sonda #	Posición gen/crom.	Comentarios
130	0797-L0463	Sonda de control, Crom. 5q31	
136	2271-L2327	Sonda de control, Crom. 1p36	
142	4817-L4191	FCGR2B, exón 3 (D03B)	Detecta FCGR2B y FCGR2C-ORF
148	3610-L2989	FCGR2A, exón 7 (D07)	
154	2679-L2144	Sonda de control, Crom. 1q25	
165	3616-L2990	FCGR3B, exón 3 (D03)	SNP detecta la variante NA2
172	2677-L2143	Sonda de control, Crom. 1q25	
181	3611-L2978	FCGR2B, el exón 1 (D01A)	Detecta FCGR2B y FCGR2C
202	4812-L4186	FCGR2B, 232I/T (D05B)	SNP detecta la variante 232-T rara
211	4815-L4189	FCGR2A, exón 6 (D06B)	
220	3619-L2994	FCGR2C, intrón 3 (D03)	En la frontera intrón/exón del exón 4
229	1487-L1095	Sonda de control, Crom. 16q24	
238	0974-L0561	Sonda de control, Crom. 14q12	
247	4821-L4195	FCGR2A, exón 3 (D03C)	
265	1325-L0874	Sonda de control, Crom. 17p13	
274	3613-L2980	FCGR2B, exón 6 (D06A)	
283	4819-L4193	FCGR3B, SH (D03SH)	SNP variante FCGR3*3(SH)
292	3162-L2603	Sonda de control, Crom. 11p11	
301	1916-L1460	Sonda de control, Crom. 1q21	
310	3618-L2993	FCGR3A, exón 5 (D05)	
319	3612-L2979	FCGR2B, exón 7 (D07A)	
328	1918-L1462	Sonda de control, Crom. 1q21	
355	4814-L4188	FCGR2A, 131H/R (D04B)	SNP detecta la variante 131-R
373	2560-L2023	Sonda de control, Crom. 3q23	
382	2908-L2302	Sonda de control, Crom. Xq23	
391	4816-L4196	FCGR3A, 158V/F (D04)	SNP detecta la variante 158-V y FCGR3B

5

Tabla 2C: Información de secuencia de las sondas FCGR2 utilizadas

Longitud / Mix 1 Mix 2	Sonda #	Gen / #	Secuencia detectada
142	3605-L2972	FCGR2A-D01A	GTCTCAGAAATGTATGTCCCAGAAACCTGTGGCTGCTTCAA
..... 193	3606-L2973	FCGR2A-D01B	ATAGTCATCCCAGCACTGTGCCAACGTCCAGTGGGTTTTA
..... 247	4821-L4195	FCGR2A-D03C	TCTGTGACTCTGACATGCCAGGGGGCTCGCAGCCCTGAGA
355	4813-L4187	FCGR2A-D04A	AAATCCCAGAAATTCTCCCATTTGGATCCCACCTTCTCCAT

Longitud / Mix 1 Mix 2	Sonda #	Gen / #	Secuencia detectada
..... 355	4814-L4188	FCGR2A-D04B	GGAGAAGGTGGGATCCAAACGGGAGAATTTCTGGGATTTT
283	3608-L2975	FCGR2A-D05A	TCATTGCGACTGCTGTAGCAGCCATTGTTGCTGCTAGT
..... 211	4815-L4189	FCGR2A-D06B	AGATGGCTGGGATTACTCACCTCAAATTGGGCAGCCTTCA
..... 181	3611-L2978	FCGR2B-D01A	ATAGCACAGCTGTCCACAGAAGCATATGACCCCAAGGCTG
220	3619-L2986	FCGR2B-D03	CTGAAAGACACAAAAAACCGCAGAGGACCCGGGAGGTCTT
..... 220	3619-L2994	FCGR2B-D03B	CTGAAAGACACAGAAAACCCCAGAGGACCCGGGAGGTCTT
..... 142	4817-L4191	FCGR2B-D03B	GGCAGAGAGAGGAGGTAGCATGAAGAAGAGGAAGCCCAGG
..... 202	4812-L4186	FCGR2B-D05B-C	GTGGCTGTGGTCACTGGGACTGCTGTAGCGGCCATTGTTG
202	4812-L4198	FCGR2B-D05B-T	GTGGCTGTGGTCACTGGGATTGCTGTAGCGGCCATTGTTG
..... 274	3613-L2980	FCGR2B-D06A	CAATCCCACTAATCCTGATGAGGCTGACAAAGTTGGGGTG
.....319	3612-L2979	FCGR2B-D07A	CAATCACCTATTCATTCTCATGCACCCGGATGCTCTGGA
211	3609-L2976	FCGR2C-D06	GAAGGCTGCCCAATTTGAGATGAGTAATCCCAGCCATCTC
..... 148	3610-L2989	FCGR2C-D07	GCCATCAGAAAGAGACAACCTGAAGAAACCAACAATGACT
148	3610-L2977	FCGR2C-D07	GCCATCAGAAAGAGACAACCTGAAGAAACCAACAATGACT
400	4815-L4192	FCGR2C-PARADA	TTGGGCTTCTCTTCTCACGCTACCTCTCTCTGCCC

Tabla 2D: Información de secuencia de las sondas FCGR3 utilizadas

Longitud / Mix 1 Mix 2	Sonda #	Gen / #	Secuencia detectada
337	3614-L2981	FCGR3A-D01	TCCAGGCTCTTTCTTCTGCTGCTGTTCTATGGTGGGGC
160	3616-L2983	FCGR3A-D03	CTCAATGGTACAGGGTGCTCGAGAAGGACAGTGTGACTCT
391	4816-L4190	FCGR3A-D04	CTACTTCTGCAGGGGGCTTTTTGGGAGTAAAAATGTGTCT
..... 391	4816-L4196	FCGR3A-D04	CTACTTCTGCAGGGGGCTTGTGGGAGTAAAAATGTGTCT
..... 310	3618-L2993	FCGR3A-D05	AGACTGGAAGGACCATAAAATTTAAATGGAGAAAGGACCCT
346	3615-L2982	FCGR3B-D01	TCCACCCATCTCTGTACCTGCCAGTTTCTTTCTTGAA
..... 165	3616-L2990	FCGR3B-D03	CTCAATGGTACAGCGTGCTTGAGAAGGACAGTGTGACTCT
310	3618-L2985	FCGR3B-D05	AGACTGGAAGGACCATAAACTTAAATGGAGAAAGGACCCT

Tabla 2E: Información de secuencia de las sondas de control utilizadas

Longitud / Mix 1 Mix 2	Sonda #	Gen / #	Secuencia detectada
130	0797-L0463	IL4-D01	CACTGCAAATCGACACCTATTAATGGGTCTCACCTCCCAA
136	2271-L2327	CAB45-D01	CCACCAGGAGGTCTTCTTAGGCAAGGACCTGGGTGGCTTT
154	2679-L2144	HRPT2-D11	GAGGGTGCATCTGCCCGGAAGACTCAGACTCCTGCAGCCC
229	14871-L1095	FANCA-D15	AAGAAGGCCCTGGTCTTCTGTTTACGTTCTTGTCAGAAC
238	0974-L0561	TINF2-D01	GCGGACGCTGCGTGGAACATTTCCGCGAGTACTGGAGTT
265	1325-L0874	ASPA-D05	GCCATTGAGGTCTATAAAATTATAGAGAAAGTTGATTACC
292	3162-L2603	MNYBPC3-D29	CGTTCCGCATGTTTCAGCAAGCAGGGAGTGTGACTCTGG
301	1916-L1460	LMNA-D02	AGGGTGACCTGATAGCTGCTCAGGCTCGGCTGAAGGACCT
328	1918-L1462	LMNA-D04	AGACCCGACTGGTGAGATTGACAATGGGAAGCAGAGTGA

ES 2 369 415 T3

Longitud / Mix 1 Mix 2	Sonda #	Gen / #	Secuencia detectada
373	2560-L2023	ATR-D47	AGACCCATGTTCTTGACATTGAGCAGCGACTACAAGGTGT
382	2908-L2302	PAK3-D01	GTAACAACCGGGATTCTTCAGCACTCAACCACAGCTCCAA

Ensayo MLPA

5 El ensayo MLPA se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (MLP Holland BV, Amsterdam, Países Bajos). En resumen, se desnaturalizaron 5 µl de ADN (20 ng/µl) a 98°C durante 5 minutos y, a continuación, se enfriaron hasta 25°C en un termociclador con tapa térmica. Se añadieron a cada muestra 1,5 µl de mezcla de sondas y 1,5 µl de tampón y se incubó durante 1 min a 95°C, seguido de 16 horas a 60°C. A continuación, se añadieron 32 µl de mezcla Ligasa-65 a cada muestra, mientras estaban a 54°C, seguido de una incubación de 15 minutos a 54°C y 5 minutos a 98°C. Esta mezcla de ligación se diluyó cuatro veces. Se añadieron 10 µl de mezcla de polimerasa que contiene un único par de cebadores. Inmediatamente después de añadir la mezcla de polimerasa se inició la reacción de PCR. Las condiciones de la PCR fueron de 36 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 60 segundos a 72°C, seguidos de 20 min a 72°C. A continuación de la reacción de PCR, se mezcló 1 µl de la reacción de PCR con 0,5 µl de estándar de tamaño interno CXR 60-400 (Promega) y 8,5 µl de formamida desionizada y se incubó durante 10 minutos a 90°C. A continuación, los productos fueron separados mediante electroforesis en un ABI-3100.

Análisis de los datos

20 El análisis de un número limitado de muestras se puede hacer mediante un examen visual de los picos de la electroforesis capilar. Para el análisis de un gran número de muestras se utiliza de forma adecuada el programa Genemarker (v 1.30). En resumen, los perfiles de los picos de las electroforesis capilares se importan al programa y, a continuación, se normalizan las señales para la intensidad de las señales utilizando las sondas de control asignadas. Como MLPA es una forma de cuantificación relativa, una muestra tiene que ser asignada como muestra de referencia. La altura normalizada (o el área) del producto de amplificación de la sonda de la muestra desconocida se divide por la altura normalizada de ese producto de amplificación de la referencia. Una relación entre 0,8-1,2 se considera normal, por debajo de 0,8 se considera como pérdida en el número de copias y por encima de 1,2 se considera como aumento del número de copias.

Resultados en pacientes con la enfermedad de Kawasaki

30 Los **SNP**; mediante los procedimientos convencionales de PCR de SNP no se pudieron detectar diferencias significativas en muestras de 170 pacientes con la enfermedad de Kawasaki (Biezeveld y otros, Fc gamma Receptors in Kawasaki disease, The involvement of Fc gamma receptor gene polymorphisms in Kawasaki disease ("Receptores en la enfermedad de Kawasaki, La implicación de los polimorfismos del gen receptor FC gamma en la enfermedad de Kawasaki"). Clin Exp Immunol. 2007; 106-111). Se analizaron ADN de 70 muestras conocidas (utilizadas en un estudio previo con procedimientos de PCR convencionales para determinar el genotipo de los SNP en el grupo de genes *FCGR*) con el ensayo MLPA para validar las sondas que identifican los SNP. Las únicas discrepancias observadas fueron provocadas por el hecho de que con los procedimientos convencionales no es posible una cuantificación absoluta y, por lo tanto, una muestra con sólo un alelo *FCGR3B* se tipificó como NA2/NA2 (homocigotos) en vez de NA2/nulo con el nuevo procedimientos MLPA.

Los **CNP**; se ensayaron ADN de 70 pacientes con la enfermedad de Kawasaki (KD) y 100 controles caucásicos sanos.

45 - En 30 muestras de KD se observó producto de amplificación del exón 3 de *FCGR2B*, mientras que éste no se observó en ninguna de las muestras de control.

- En 23 muestras de KD (32%) se observó un *FCGR2C-ORF* (marco abierto de lectura en el exón 3), que da como resultado un receptor activador, en comparación con el 18% en los controles sanos ($p < 0,05$).

50 - En 3 muestras de KD se observaron 3 copias del gen completo *FCGR3A*, no encontradas en las muestras de control.

55 - En 3 muestras de KD y dos muestras de control se observaron 3 copias del gen completo *FCGR3B*, sin estar presente la variante SH en una de las copias.

Resultados en pacientes con ITP

60 Se ensayaron ADN de 116 muestras de pacientes con ITP mediante el ensayo MLPA. Se encontró una variación aumentada en los grupos de genes *FCGR2* y *FCGR3* en pacientes con ITP caucásicos en comparación con los controles caucásicos sanos (n=100).

- En el gen *FCGR2C*, un SNP en el exón 3 convierte una glutamina en el marco de lectura abierto (ORF) al codón de parada que se encuentra de forma más común. En el grupo de control, el 82% de los individuos fueron homocigóticos de *FCGR2C*^{parada/parada}. Mientras que, el gen *FCGR2C*-ORF estuvo presente en el 18% de los individuos sanos, *FCGR2C*-ORF se encontró en el 35% de los pacientes con la enfermedad autoinmune hematológica ITP (n=116; relación de posibilidades (OR): 2,4, intervalo de confianza del 95% (95%CI): 1,3-4,3; p=0,009). Se tiene la evidencia que el gen *FCGR2C*-ORF traduce a un receptor de IgG activador en la membrana celular, ejerciendo actividad mediada por anticuerpos, tal como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) por las células del sistema inmunitario.
- También se observó una diferencia significativa en la frecuencia del genotipo (p=0.01) y alelos (p=0,02) para el polimorfismo promotor -386G/C. El genotipo -386CC fue raro y solamente se observó en un paciente con ITP.
- En la misma serie de muestras de ADN, se confirmó la sobrerepresentación observada previamente del SNP en *FCGR3A* que codifica la variante FcγRIIIa-158V, que es la más prevalente en ITP con comienzo en la infancia (p=0,0005) y no en ITP con comienzo en la adultez (p=0,3).

Variantes de empalme de FCGR2C

- Hasta la fecha, se han descrito cinco variantes de empalme de FcγRIIc, dos de las cuales resultan en un receptor anclado a membrana, es decir, FcγRIIc1 codificado por el transcrito completo y FcγRIIc3 descrito como que le falta el exón 7. Se ha planteado la hipótesis que el empalme alternativo del transcrito FcγRIIc está restringido al alelo *FCGR2C*-parada. Para investigar esto, se clonaron los transcritos FcγRIIc de un único individuo con un genotipo *FCGR2C*^{ORF/ORF} y tres individuos con un genotipo *FCGR2C*^{ORF/parada} en un vector de expresión bacteriano y se obtuvo la secuencia, como mínimo, de 20 clones por individuo. Después de secuenciar todos estos clones, se encontró que los individuos con genotipo *FCGR2C*^{ORF/ORF} o *FCGR2C*^{ORF/parada} solo expresan FcγRIIc1 (datos no mostrados).

Distribución de la expresión de FCGR2C

- A continuación, se investigó la expresión de ARNm de las isoformas de FcγRII en neutrófilos, monocitos, células NK, células T y células B de voluntarios sanos. Se encontraron transcritos de FcγRIIa, FcγRIIb2 y FcγRIIc, pero no de FcγRIIb1, en neutrófilos y monocitos, mientras que las células B solamente contenían FcγRIIb1 (FcγRIIb1 contiene el exón 6 de *FCGR2B*, FcγRIIb2 no contiene este exón). Las células T no expresaron ninguna de las isoformas de FcγRII, mientras que las células NK solamente expresaron FcγRIIc.

Expresión de FcγRIIc en células NK

- FCGR2A*, *FCGR2B* y *FCGR2C* tienen una homología de secuencia de un 92-96%. No existen anticuerpos monoclonales disponibles que puedan distinguir realmente entre FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIIc, lo que hace difícil la cuantificación de la expresión de proteínas en las células. Sin embargo, se ha encontrado que las células NK solamente expresan ARNm de la isoforma FcγRIIc. Por esta razón, se examinó la expresión de FcγRIIc en células NK de individuos con el genotipo *FCGR2C*^{ORF/parada} y el genotipo *FCGR2C*^{parada/parada}. Se encontró que la presencia de un alelo de *FCGR2C*-ORF se correlaciona con la expresión de FcγRII en células NK, mientras que la ausencia de un alelo funcional se corresponde con la ausencia de FcγRII en células NK (figura 3B y tabla 3). Por lo tanto, se concluyó que FcγRIIc está presente en células NK.

Tabla 3

Muestra	expresión		MLPA		PCR específico de gen			
	Células NK	MFI	<i>FCGR2C</i> parada/ORF	2B/C-386	2B-386	2B-120	2C-386	2C-120
1	no	nd	parada/parada	W				
2	no	nd	parada/parada	W				
3	no	nd	parada/parada	W				
4	no	nd	parada/parada	W				
5	no	nd	parada/parada	W				
6	no	nd	parada/parada	W				
7	no	nd	parada/parada	W				
8	no	nd	parada/parada	W				
9	no	nd	parada/parada	W				
10	no	nd	parada/parada	W				
11	sí	590	ORF/parada	He	GC	TA	GC	TT
12	sí	1188	ORF/parada	He	GC	TA	GC	TT
13	sí	1648	ORF/parada	He	GC	TA	GC	TT
14	sí	2602	ORF/parada	He	GC	TA	GC	TT

	expresión		MLPA		PCR específico de gen			
15	sí	2123	ORF/parada	He	GC	TA	GC	TT
16	sí	1109	ORF/parada	He	GC	TA	GC	TT
17	sí	2380	ORF/parada	He	GC	TA	GC	TT
18	sí	1243	ORF/parada	He	GC	TA	GC	TT
19	sí	1394	ORF/parada	He	CC	AA	GC	TT
20	sí	1629	ORF/parada	He	GC	TA	GC	TT

Activación in vitro de células NK

5 La expresión de FcγRIIc en células NK se midió 3 veces en varios intervalos de tiempo (intervalo de 2 a 5 meses) en cuatro individuos con el genotipo *FCGR2C*^{ORF/parada}. Se observó poca fluctuación en el tiempo (MFI ± SEM: 1707 ± 211). El posterior ensayo en cultivos de células NK con los activadores de células NK IL-2 o IL-15 mostró la capacidad para modular la expresión de FcγR en células NK. Se encontró que IL-2 e IL-15 regulan de forma ascendente la expresión superficial de FcγRIIIa en células NK. Por el contrario, la expresión de FcγRIIc se reguló de forma descendente durante el cultivo, aunque IL-15 rescató de forma significativa la pérdida de expresión de FcγRIIc en comparación con IL-12 o medio (figura 3C).

10 Debido a que la expresión superficial de FcγRIIc en neutrófilos y monocitos en la actualidad no puede ser controlada por la falta de anticuerpos específicos, la regulación de ARNm de FcγRIIc en estas células se ensayó después de incubar neutrófilos así como PBMC con los activadores inflamatorios LPS, GM-CSF o TNFα. En particular, GM-CSF indujo una fuerte regulación ascendente de ARNm de FcγRIIc en neutrófilos obtenidos de individuos con un genotipo *FCGR2C*^{ORF/parada}, mientras que esto se encontró en un grado significativamente inferior en individuos con un genotipo *FCGR2C*^{parada/parada} (p<0,01, figura 3D).

20 *Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos redirigida*

Para evaluar si la expresión de FcγRIIc en células inmunes innatas era funcionalmente activa, se ensayó la capacidad de las células NK de destruir dianas recubiertas con anticuerpos. Para fijar como diana de forma selectiva a FcγRIIc o FcγRIIIa en las células NK, se empleó el ensayo rADCC, que implica la línea celular P815 de mastocitoma murino que porta FcγR cargada con anticuerpos anti-FcγRII o anti-FcγRIII.

25 Las células NK de un donador de genotipo *FCGR2C*^{ORF/parada} destruyeron las células diana cargadas con anti-FcγRII y anti-FcγRIII (figura 3E). Por el contrario, las células NK de un donador de genotipo *FCGR2C*^{parada/parada} solamente fueron capaces de destruir células diana cargadas con anti-FcγRIII. Cuando se redujo la expresión de FcγRIIc cultivando células NK en presencia de citoquinas activadoras, el efecto de reticulación de FcγRIIc en el ensayo rADCC mostró una capacidad de destrucción aún más pronunciada en las células NK activadas con IL-2 o IL-15 (figura 3F).

30 En conclusión, estos datos muestran que *FCGR2C*-ORF predispone a ITP. Los presentes inventores han demostrado que FcγRIIc es expresada por fagocitos y células NK y que esto mejora las funciones hacia dianas recubiertas por anticuerpos. Además, se ha demostrado que en condiciones inflamatorias (GM-CSF o IL-15), la función de FcγRIIc es incluso adicionalmente mejorada. Por lo tanto, en conjunto, estos resultados muestran que *FCGR2C* es un gen expresado de forma variable altamente relevante para la inmunidad y que puede servir como marcador de pronóstico y diagnóstico para evaluar la susceptibilidad y severidad de infecciones y enfermedades autoinmunes.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para determinar si un individuo está predispuesto a desarrollar la enfermedad de Kawasaki (KD) o Púrpura Trombocitopénica Idiopática (ITP), que comprende:
- 10 - determinar en una muestra aislada de dicho individuo la cantidad de los genes en el grupo de genes *FcγRII/FcγRIII*, comprendiendo dicho grupo de genes los genes *FCGR2C*, *FCGR3A*, *FCGR2A* y *FCGR3B*, que codifican un *FcγR* activador y *FCGR2B* que codifica un *FcγR* inhibidor, en el que la determinación de la cantidad de dichos genes comprende, como mínimo, determinar la presencia del gen *FCGR2C-ORF*, opcionalmente además comprende detectar un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en un exón, intrón y/o región promotora, como mínimo, de un gen seleccionado del grupo que comprende *FCGR2C*, *FCGR2B*, *FCGR2A*, *FCGR3A* y *FCGR3B*; y
 - 15 - correlacionar dicha cantidad con la cantidad observada en una población sana; en el que una cantidad mayor de los genes que codifican un *FcγR* activador, y/o una cantidad menor del gen que codifica un *FcγR* inhibidor es indicativa de que tiene mayor probabilidad de desarrollar KD o ITP.
- 20 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende detectar la cantidad del gen *FCGR2C-ORF* en combinación con la determinación de las frecuencias de alelos del SNP *FCGR3A* para la variante o variantes *FcγRIIIa-158F* y/o *FcγRIIIa-158V*, y/o determinar la frecuencia de alelos para el polimorfismo promotor de *FCGR2B* o *C-386G/C*.
- 25 3. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende detectar la cantidad del gen *FCGR2C-ORF* en combinación con la detección de la cantidad del gen *FCGR3A*.
- 30 4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la determinación del número de copias comprende correlacionar la cantidad de genes dianas con la cantidad de un gen de referencia en una muestra de ácido nucleico de dicho individuo, en el que el gen de referencia es el gen *CYBB* o un ortólogo del mismo.
- 35 5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que dicho gen de referencia *CYBB* se detecta utilizando cebadores específicos de *CYBB* en el exón 8 o alrededor del mismo.
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 5, que comprende la detección, como mínimo, de un SNP en la región promotora del gen *FCGR2B/C*, y/o la detección, como mínimo, de un SNP en el gen *FCGR3A*, preferentemente aquellas que resulten en las variantes *FcγRIIIa-158F* y/o *FcγRIIIa-158V*.
- 40 7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que dicho, como mínimo, un SNP en la región promotora del gen *FCGR2B/C* es un SNP en el nucleótido –386 y/o –120, preferentemente haplotipo 2B.1 (-386C/-120A).
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la utilización de tecnología de amplificación de sonda dependiente de ligación múltiple (MLPA).
- 45 9. Procedimiento, según la reivindicación 8, utilizando una sonda MLPA capaz de detectar una secuencia diana según cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 52, preferentemente una sonda *FCGR2* capaz de detectar una secuencia diana según cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 33 y/o una sonda *FCGR3* capaz de detectar una secuencia diana según cualquiera de las SEQ ID NO: 34 a 41.

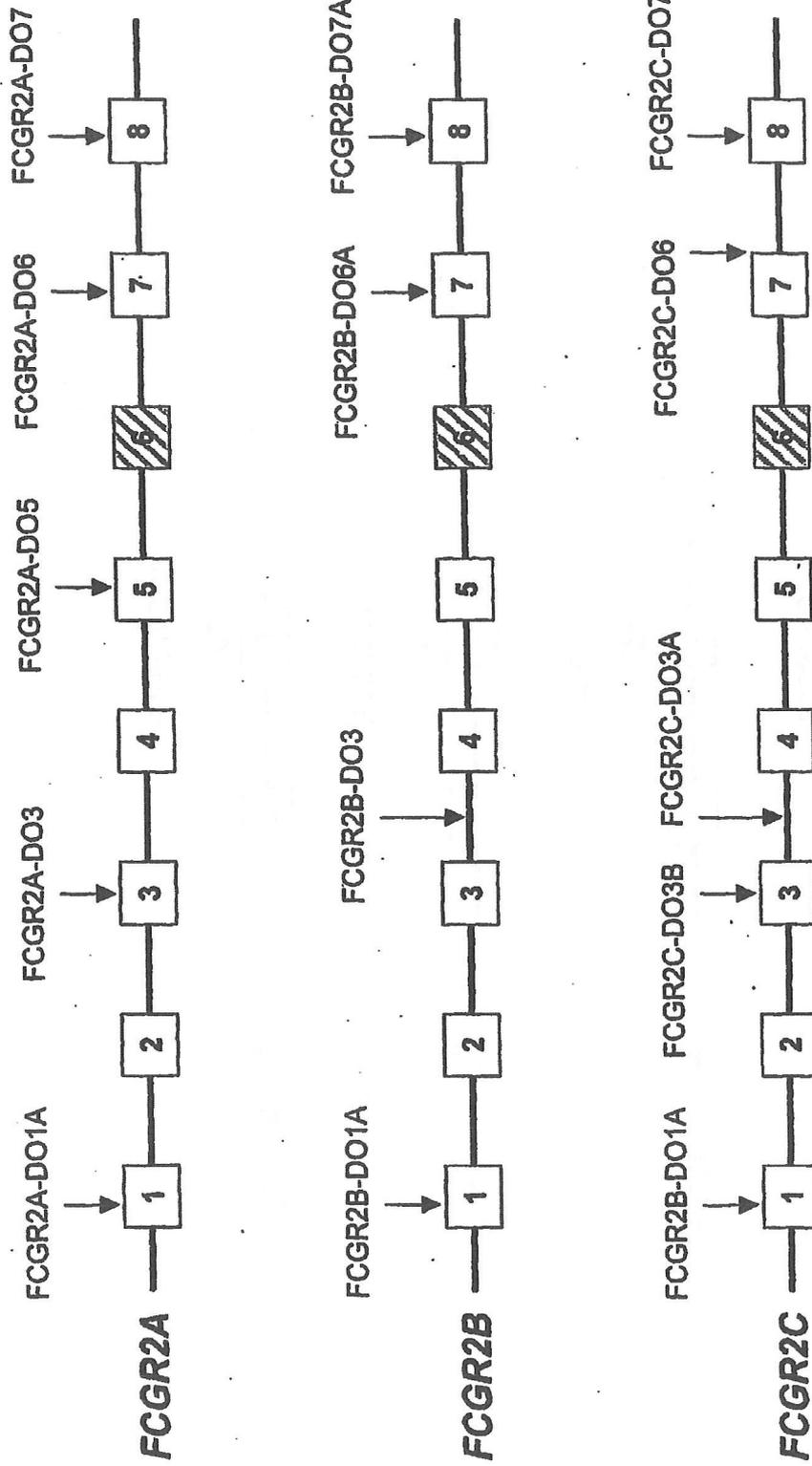


Fig 1A

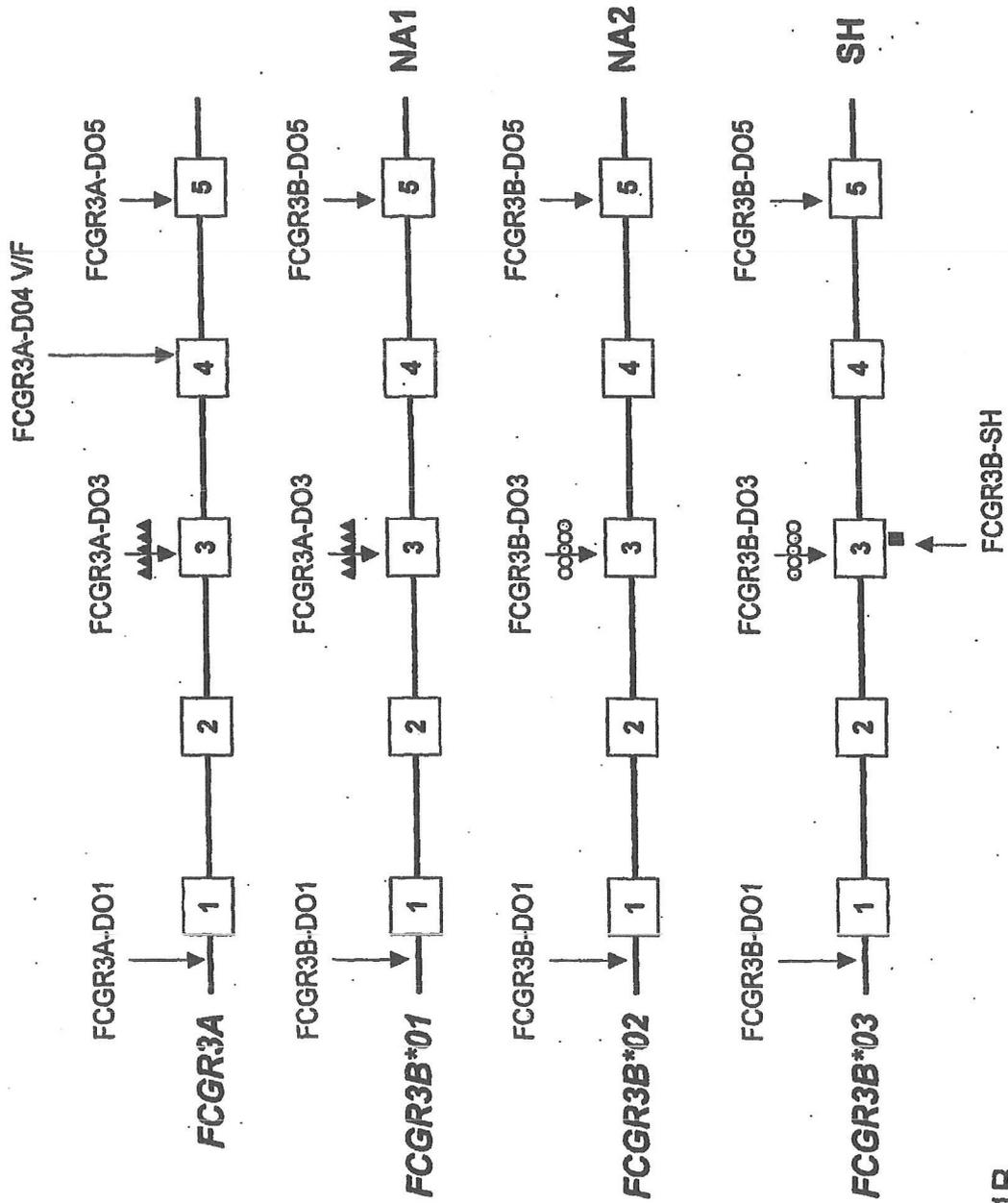


Fig 1B

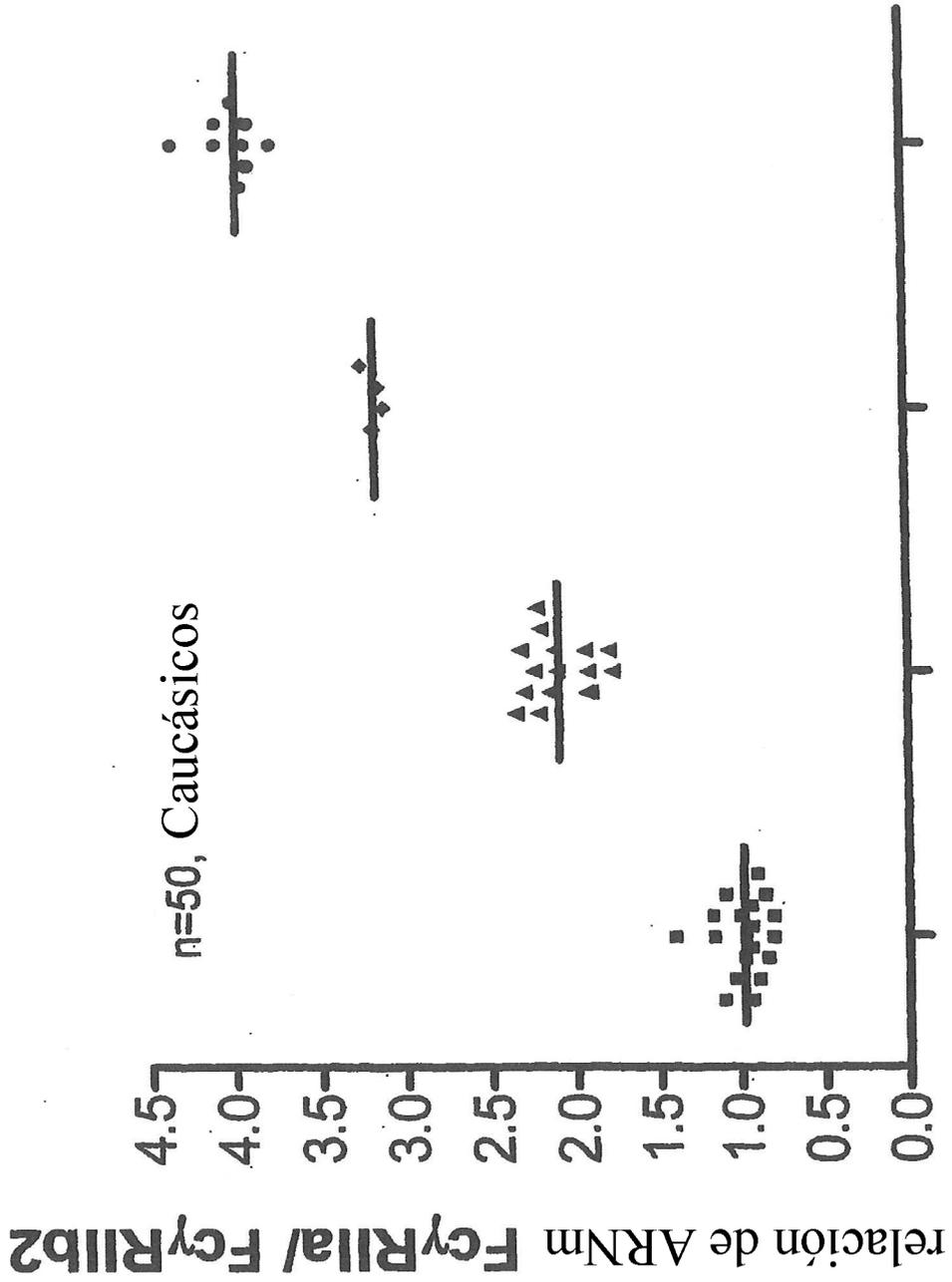


Figure 2

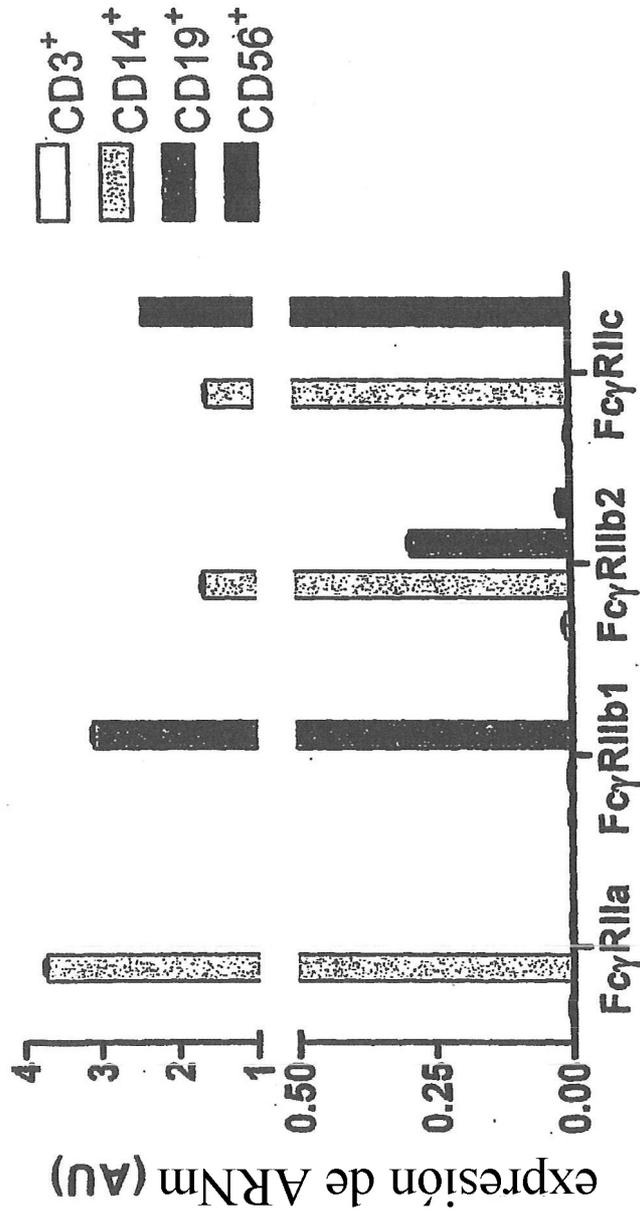


Fig 3A

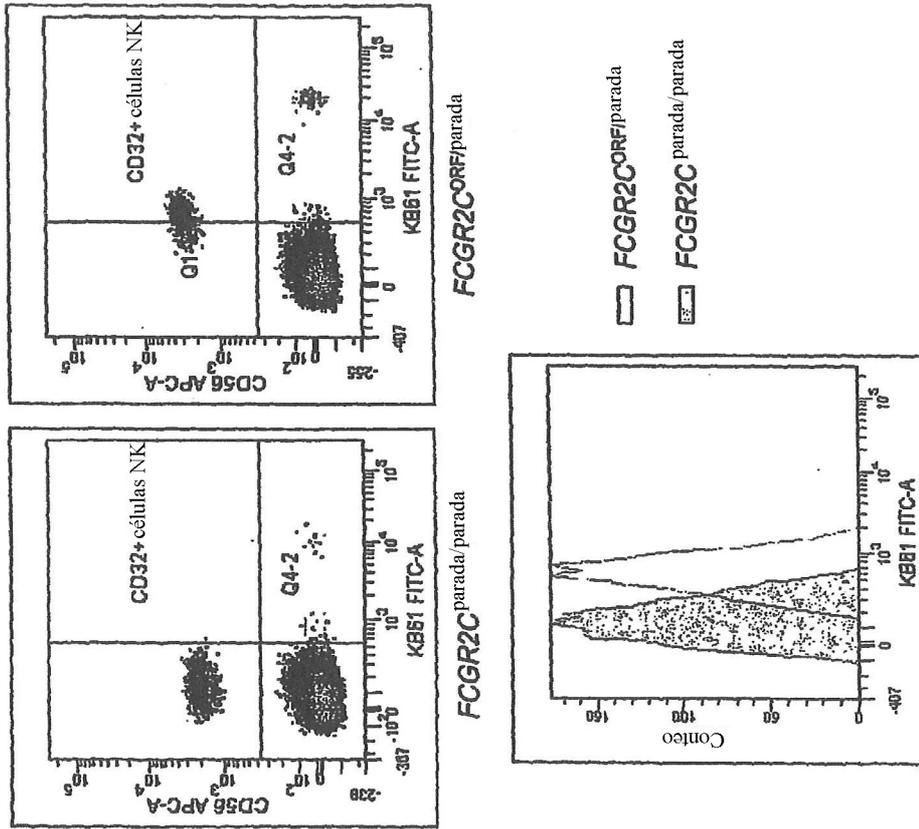


Fig 3B

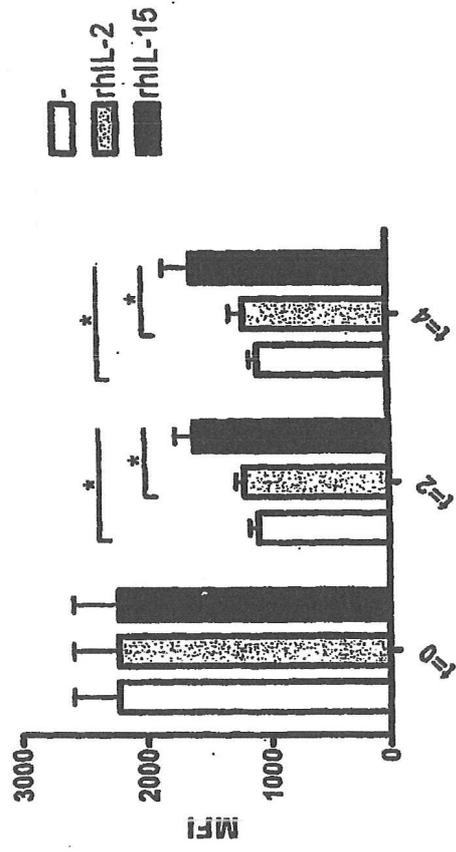


Fig 3C

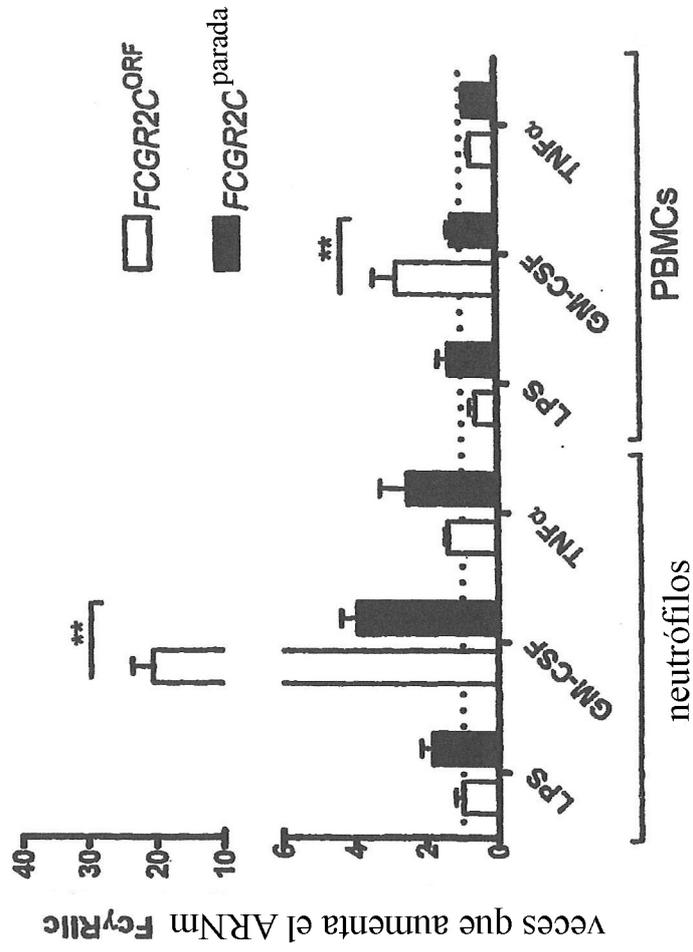


Fig 3D

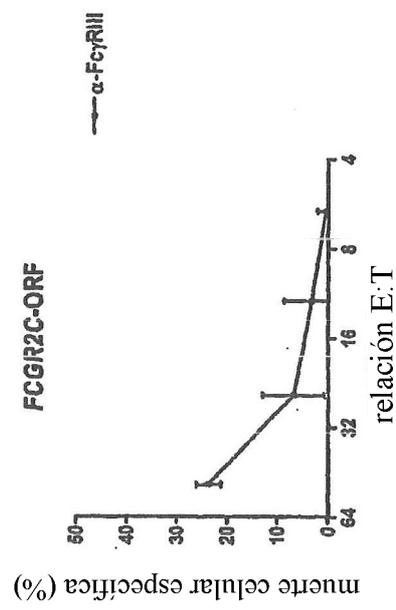
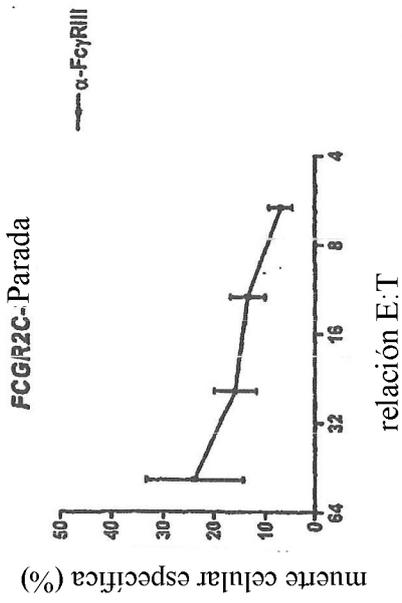
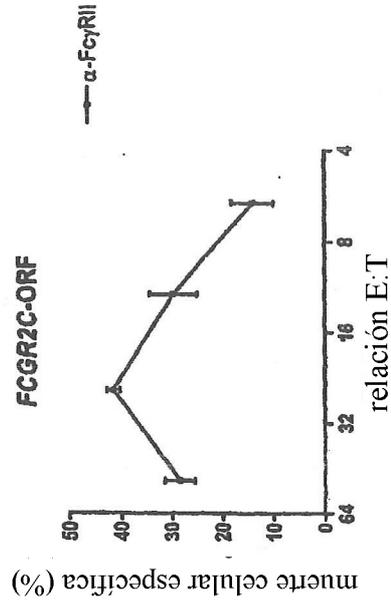
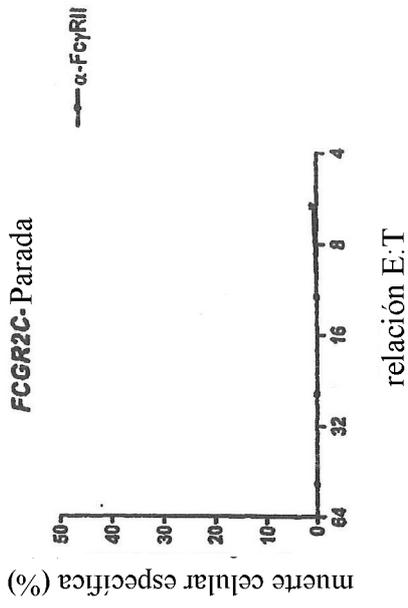


Fig 3E

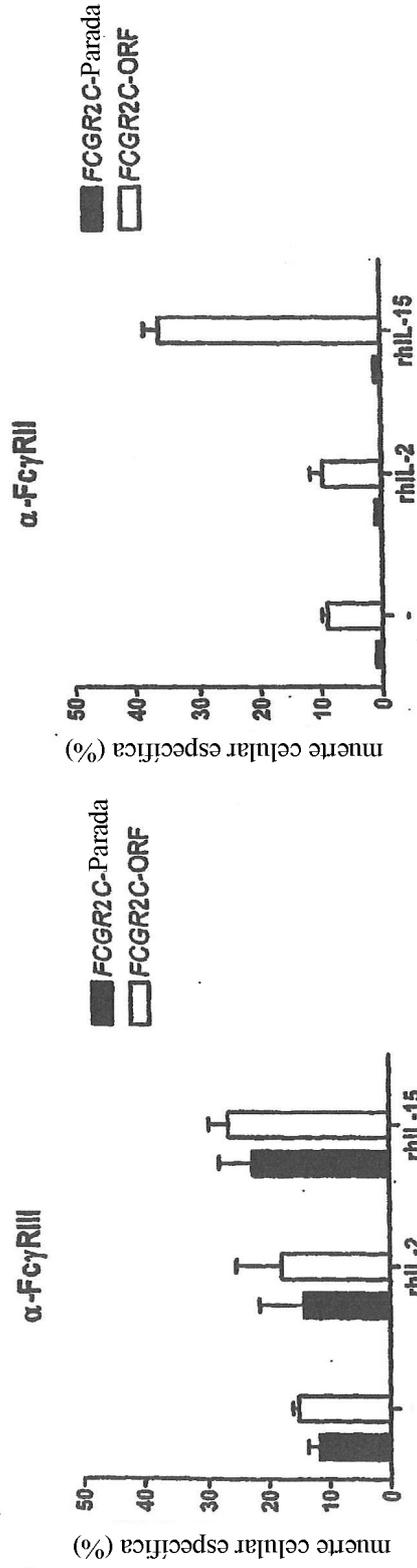


Figure 3F