

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 695**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

C12Q 1/6888 (2008.01)

C12N 5/0786 (2010.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2013 PCT/EP2013/055159**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13135775**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2013 E 13709109 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2825664**

54 Título: **Transcriptoma de alta resolución de macrófagos humanos**

30 Prioridad:

14.03.2012 EP 12159479

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2020

73 Titular/es:

**RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-
UNIVERSITÄT BONN (50.0%)**

Regina-Pacis-Weg 3

53115 Bonn, DE y

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (50.0%)

72 Inventor/es:

SCHULTZE, JOACHIM y

MALLMANN, MICHAEL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 745 695 T3

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

DESCRIPCIÓN

Transcriptoma de alta resolución de macrófagos humanos

La invención se basa en el hallazgo de marcadores de superficie específicos para macrófagos de tipo M1 y M2 y proporciona un procedimiento para identificar, distinguir entre y aislar macrófagos de tipo M1 (activados clásicamente) y de tipo M2 (activados alternativamente) en función de la abundancia de dichos marcadores de superficie y medios para realizar dicho procedimiento.

Antecedentes de la invención

Los macrófagos representan células fagocíticas residentes en los tejidos y están involucrados en la homeostasis tisular y en la inducción de reacciones inflamatorias contra patógenos mediante el uso de su amplia gama de receptores de reconocimiento de patrones (Geissmann F. y col., Science 327 (5966): 656-661 (2010)). En el contexto de la respuesta inmunitaria respectiva, los macrófagos, a menudo denominados macrófagos de fenotipo de tipo M1 y de tipo M2, están polarizados con respecto a propiedades funcionales específicas. Los macrófagos de tipo M1 polarizados clásicamente pueden inducirse con IFN- γ en solitario o junto con LPS o TNF- α utilizando M-CSF o GM-CSF (Martinez F.O. y col., The Journal of Immunology 177 (10): 7303-7311 (2006)). Los macrófagos de tipo M1 son células efectoras de respuestas inmunitarias inflamatorias clásicas que ejercen un fenotipo IL-12^{alto}, IL-23^{alto} e IL-10^{bajo} con secreción de citocinas inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Muestran un fenotipo caracterizado por la expresión de CD86, CD64 y CD16 (Biswas S.K., Mantovani A., Nat Immunol. 11(10):889-896 (2010); Mantovani A., Sica A., Curr Opin Immunol. 22(2):231-237 (2010)). En cambio, los macrófagos que se activan por otros mecanismos distintos de IFN- γ /LPS/TNF- α se agrupan en el subconjunto de macrófagos de tipo M2 activados alternativamente. Los macrófagos no activados clásicamente pueden inducirse con citocinas que incluyen IL-4 e IL-13, pero también se han descrito otros estímulos (Biswas SK, Mantovani A., Nat Immunol. 11(10):889-896 (2010); Mantovani A., Sica A., Curr Opin Immunol. 22(2):231-237 (2010)). Estas células comparten un fenotipo IL-12^{bajo} e IL-23^{bajo} y expresan CD23. Durante la última década, las adaptaciones fenotípicas de los macrófagos a los estímulos ambientales se han relacionado con cambios radicales en la regulación transcripcional, principalmente mediante la aplicación de perfiles de expresión génica basados en micromatrices (Martinez FO y col., The Journal of Immunology 177 (10): 7303-7311 (2006); Gustafsson C, Mjosberg J, Matussek A. y col., PLoS ONE. 3 (4): e2078 (2008); Lehtonen A. y col., J Leukoc Biol. 82(3):710-720 (2007); Nau G.J. y col., Proc Natl Acad Sci U S A 99(3):1503-1508 (2002)). De hecho, se ha recopilado una gran cantidad de datos que cubren la reprogramación transcripcional de macrófagos, aunque no siempre es sistemática (Martinez F.O. y col., The Journal of Immunology 177 (10): 7303-7311 (2006); Gustafsson C. y col., PLoS ONE. 3 (4): e2078 (2008); Lehtonen A. y col., J Leukoc Biol. 82(3):710-720 (2007); Nau G.J. y col., Proc Natl Acad Sci U S A 99(3):1503-1508 (2002); Heng T.S. y col., Nat Immunol. 9(10):1091-1094 (2008)). Sin embargo, los mecanismos moleculares que controlan la reprogramación transcripcional en los macrófagos están lejos de entenderse y se ha sugerido que se requerirán análisis integradores de datos epigenómicos y transcriptómicos para comprender mejor cómo integran los macrófagos la información que reciben de sus respectivos microambientes (Lawrence T., Natoli G., Nat Rev Immunol. 11(11):750-761 (2011)), permitiendo la identificación de combinaciones específicas de factores de transcripción responsables de los programas de macrófagos celulares.

La introducción de la secuenciación de ARN (sec-ARN) para examinar transcriptomas completos ha supuesto un reto para los estudios de perfiles de expresión génica previamente establecidos (Ozsolak F., Milos P.M., Nature reviews Genetics 12(2):87-98 (2011); Wang Z, Gerstein M, Snyder M., Nature reviews Genetics 10 (1): 57-63 (2009); Marioni J.C. y col., Genome Res. 18(9):1509-1517 (2008)). Las ventajas atribuidas a la sec-ARN sobre el análisis de micromatrices incluyen aumentos en la cantidad y calidad de los transcritos, detección mejorada de acontecimientos de corte y empalme alternativo y transcritos de fusión génica, y un rango dinámico de detección más amplio (Ozsolak F., Milos PM, Nature reviews Genetics 12(2):87-98 (2011); Wang Z. y col., Nature reviews Genetics 10 (1): 57-63 (2009); Marioni J.C. y col., Genome Res. 18(9): 1509-1517 (2008)).

Breve descripción de la invención

Para comprender mejor la polarización e integración de las señales ambientales por parte de los macrófagos e identificar marcadores más específicos para diferentes estados funcionales, se han solicitado datos de transcriptoma de alta resolución (Murray P.J., Wynn T.A., Nat Rev Immunol. 11(11):723-737 (2011)). Utilizando la polarización de M1 y M2 como modelos, se aplicó sec-ARN y se comparó el contenido de la información con los datos derivados del análisis de micromatrices. Proporcionamos nuevos conocimientos sobre la biología de los macrófagos humanos y determinamos varios marcadores nuevos asociados a la polarización clásica y alternativa de macrófagos en seres humanos.

Por tanto, la invención proporciona

(1) un procedimiento *in vitro* para identificar, distinguir entre y aislar macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 que comprende la caracterización de los macrófagos en función del nivel de expresión de uno o más de los marcadores de superficie celular específicos asociados a M1 CD120b que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1, TLR2 que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 3 y SLAMF7 que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 5, o de uno o más de los marcadores de superficie celular específicos asociados

a M2 CD1a que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 7, CD1b que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 9, CD93 que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 11 y CD226 que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 13, respectivamente, en el que el nivel de expresión de los marcadores de superficie celular asociados a M1 es al menos 30 % mayor en macrófagos de tipo M1 que en macrófagos de tipo M2 y el nivel de expresión de los marcadores de superficie celular asociados a M2 es al menos 30 % mayor en macrófagos de tipo M2 que en macrófagos de tipo M1;

(2) una realización preferida del aspecto (1) anterior, en el que la identificación de y la distinción entre los macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 se realiza mediante una amplificación o mediante una resecuenciación dirigida de uno o más de los ácidos nucleicos marcadores de superficie celular específicos asociados a M1 CD120b, TLR2 y SLAMF7 (SEQ ID NO: 1, 3 y 5), o de uno o más de los ácidos nucleicos marcadores de superficie celular específicos asociados a M2 CD1a, CD1b, CD93 y CD226 (SEQ ID NO: 7, 9, 11 y 13), respectivamente, del macrófago, en particular utilizando uno o más cebadores derivados de cada uno de los ácidos nucleicos marcadores, y una detección posterior del producto de amplificación/resecuenciación;

(3) una realización preferida del aspecto (1) anterior, en el que la identificación de y la distinción entre los macrófagos de tipo M1 y de tipo M2, comprende hibridar una o más sondas selectivas con uno de los ácidos nucleicos marcadores de superficie celular específicos asociados a M1 CD120b, TLR2 y SLAMF7 (SEQ ID NO: 1, 3 y 5), o para uno de los ácidos nucleicos marcadores de superficie celular específicos asociados a M2 CD1a, CD1b, CD93 y CD226 (SEQ ID NO: 7, 9, 11 y 13), respectivamente, del macrófago;

(4) una realización preferida del aspecto (3) anterior, en la que la hibridación se realiza en una matriz de hibridación;

(5) una realización preferida del aspecto (1) anterior, en la que la identificación de, la distinción entre y al aislamiento de los macrófagos de tipo M1 y de tipo M2, comprende poner en contacto los macrófagos con una o más moléculas de unión dirigidas contra las proteínas marcadoras de superficie celular específicas asociadas a M1 CD120b, TLR2 y SLAMF7 (SEQ ID NO: 2, 4 y 6), o con una o más moléculas de unión dirigidas contra las proteínas marcadoras de superficie celular específicas asociadas a M2 CD1a, CD1b, CD93 y CD226 (SEQ ID NO: 8, 10, 12 y 14), respectivamente;

(6) el uso de un kit para realizar el procedimiento según los aspectos (1) a (5) anteriores, cuyo kit comprende al menos un reactivo para identificar, distinguir entre y aislar macrófagos de tipo M1 y al menos un reactivo para identificar, distinguir entre y aislar macrófagos de tipo M2, seleccionándose dichos reactivos de

(i) uno o más cebadores derivados de los ácidos nucleicos marcadores como se define en el aspecto (2) anterior,

(ii) una o más sondas selectivas para los ácidos nucleicos marcadores de la superficie celular como se define en el aspecto (3) anterior,

(iii) una matriz de hibridación como se define en el aspecto (4) anterior, o

(iv) una o más moléculas de unión como se define en el aspecto (5) anterior;

(7) el uso de anticuerpos seleccionados de anticuerpos dirigidos contra CD120b que tienen la secuencia proteica de la SEC ID NO: 2, anticuerpos dirigidos contra TLR2 que tienen la secuencia proteica de la SEQ ID NO: 4 y anticuerpos dirigidos contra SLAMF7 que tienen la secuencia proteica de la SEQ ID NO: 6 para realizar el procedimiento de acuerdo con los aspectos (1) a (5) anteriores, en el que los anticuerpos son para identificar, caracterizar y aislar macrófagos de tipo M1;

(8) el uso de anticuerpos seleccionados de anticuerpos dirigidos contra CD1a que tienen la secuencia proteica de la SEC ID NO: 8, anticuerpos dirigidos contra CD1b que tienen la secuencia proteica de la SEC ID NO: 10, anticuerpos dirigidos contra CD93 que tienen la secuencia proteica de la SEQ ID NO: 12 y anticuerpos dirigidos contra CD226 que tienen la secuencia proteica de la SEQ ID NO: 14 para realizar el procedimiento según los apartados (1) a (5) anteriores, en el que los anticuerpos son para identificar, caracterizar y aislar macrófagos de tipo M2.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Caracterización fenotípica de macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2 derivados de monocitos CD14⁺ de sangre periférica. La expresión de marcadores de linaje de macrófagos típicos se determinó por citometría de flujo (izquierda) de macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 generados en presencia de GM-CSF (panel superior) o de M-CSF (panel inferior) mostrándose la cuantificación en el gráfico de la derecha. Expresión de (a) CD11b, (b) CD14, (c) CD68, (d) HLA-DR, (e) CD64, (f) CD86 y (g) CD23, respectivamente. *P < 0,05 (prueba de la t de Student). Los números que aparecen en los gráficos indican la intensidad de fluorescencia media. Los datos son representativos de nueve experimentos independientes (a, b, d, e, f, g; media y e.e.m. (error estándar de la media)) o de ocho experimentos independientes (c; media y e.e.m.), cada uno de ellos realizado con células derivadas de un donante diferente.

Figura 2: Huella genética de ARN basada en micromatrices de macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2. (a) Análisis de los componentes principales de macrófagos humanos no polarizados (M0) y polarizados (M1, M2). (b) Agrupación jerárquica no supervisada de macrófagos humanos de tipo M0, M1 y M2. (c) Visualización en forma de mapa cromático de marcadores conocidos para macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2. Los datos se normalizaron a puntuación z. (d) Izquierda: red de genes altamente expresados en macrófagos de tipo M1 (factor de cambio >2,0) en comparación con macrófagos M0 identificados por análisis de micromatrices. Derecha: para la comparación de macrófagos de tipo M2 frente a M0 los datos se cargaron en la red asociada a M1. (e) Derecha: red de genes altamente expresados en macrófagos de tipo M2 (factor de cambio >1,65) en comparación con

macrófagos M0 identificados por análisis de micromatrices. Izquierda: para la comparación de macrófagos de tipo M1 frente a M0 los datos se cargaron en la red de M2. Todas las redes se generaron utilizando el programa REAG. **Figura 3:** Comparación de sec-ARN y análisis de micromatrices. (a) Número de genes expresados en macrófagos humanos de tipo M1- (izquierda) y de tipo M2 (derecha) detectados utilizando sec-ARN (negro) y análisis de micromatrices (blanco). (b) Correlación (Spearman) de los valores medios de expresión de macrófagos similares a M1 (izquierda) y similares a M2 (derecha) utilizando sec-ARN y análisis de micromatrices. (c-d) Comparación de genes expresados diferencialmente detectados utilizando sec-ARN o análisis de micromatrices ($p < 0,05$). Los genes expresados diferencialmente, evaluados por sec-ARN (color negro) o análisis de micromatrices (color blanco), se dividieron en grupos con respecto a su expresión relativa en (c) M1 frente a M2 o (d) M2 frente a M1. (e) Expresión génica en macrófagos de tipo M1 frente a M2 como gráfico de factor de cambio frente a factor de cambio que compara análisis de micromatrices con sec-ARN utilizando todos los genes de Refseq expresados diferencialmente en sec-ARN. (f) diagrama de Venn de genes expresados diferencialmente entre macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 en sec-ARN (color gris claro) y análisis de micromatrices (color gris oscuro), ($FC > 2$, valor de $p < 0,05$, $\text{dif} > 100$ para datos de micromatrices). Gráficos de clasificación de factor de cambio de genes detectados diferencialmente entre macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 (g) mediante análisis de micromatrices (color gris oscuro) con superposición de valores obtenidos por sec-ARN (color gris claro) o (h) por sec-ARN (color gris claro) con superposición de valores obtenidos por análisis de micromatrices (color gris oscuro). (i) Visualización en forma de mapa cromático de marcadores conocidos para macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2 de la Figura 2c utilizando sec-ARN. Los datos se normalizaron a puntuación z.

Figura 4: Correlación de sec-ARN, análisis de micromatrices, PCRC y citometría de flujo. Expresión de (a-d) CD68, (e-h) CD64 y (i-l) CD23, en macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2. (a, e, i) panel superior, imágenes representativas de lecturas de secuenciación entre los locus genómicos de genes expresados en macrófagos humanos. Imágenes extraídas del Visualizador Integrative Genomics (IGV). La altura de las barras representa el número relativo acumulado de lecturas de 100 pb que abarcan una secuencia particular. Los mapas genéticos (parte inferior de cada panel, orientados en dirección 5'-3') están representados por líneas gruesas (exones) y finas (intrones). Panel inferior, valores de LPKM por sec-ARN en macrófagos de tipo M1 y de tipo M2. Izquierda (b, f, j), mapas cromáticos que presentan resultados de micromatrices de macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 de siete donantes. Los datos se normalizaron a puntuación z. Derecha, expresión relativa de ARNm. Expresión relativa de ARNm (c, g, k) por PCRC (PCR cuantitativa) en macrófagos de tipo M1 y de tipo M2. La expresión de proteínas (d, h, l) se determinó por citometría de flujo en macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2. Los datos son representativos de tres experimentos (sec-ARN, media y e.e.m.), siete experimentos (micromatrices, media y e.e.m.), al menos siete experimentos (PCRC; media y e.e.m.) y nueve experimentos (citometría de flujo), cada uno de ellos realizado con células derivadas de un donante diferente. * $P < 0,05$ (prueba de la t de Student).

Figura 5: análisis de red de datos de sec-ARN. (a) Red de genes altamente expresados en macrófagos de tipo M1 (factor de cambio $> 4,0$) identificados por sec-ARN. (b) Los datos generados por análisis de micromatrices se cargaron en la red de M1 establecida utilizando sec-ARN. (c) Red de genes altamente expresados en macrófagos de tipo M2 (factor de cambio $> 2,5$) identificados con sec-ARN. (d) Los datos generados por análisis de micromatrices se cargaron en la red de M2 establecida utilizando sec-ARN. Todas las redes se generaron utilizando el programa REAG. (e) expresión de APOL1 y (f) LILRA1 en macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2. Panel superior, imágenes representativas de lecturas de secuenciación entre genes expresados en macrófagos humanos como se describe en la Figura 4. Panel inferior, expresión relativa de ARNm por PCRC en macrófagos de tipo M1 y de tipo M2. Los datos son representativos de tres experimentos (sec-ARN y PCRC; media y e.e.m.) cada uno de ellos realizado con células derivadas de un donante diferente. * $P < 0,05$ (prueba de la t de Student)

Figura 6: Detección de corte y empalme alternativo en macrófagos humanos. (a) Expresión resumida de todos los transcritos de PDLIM7 en macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2. Izquierda, imágenes representativas de lecturas de secuenciación entre genes expresados en macrófagos humanos como se describe en la Figura 4. Derecha, valores de LPKM para PDLIM7 por sec-ARN en macrófagos de tipo M1 y de tipo M2. (b) Expresión de PDLIM7 según lo determinado por análisis de micromatrices utilizando 3 sondas diferentes que reconocen diferentes partes de los transcritos de PDLIM7 como se representa en el aspecto (a). (c) Panel superior: representación de los 3 transcritos de ARNm diferentes de Refseq. Panel inferior: abundancia de los diferentes transcritos según lo determinado utilizando Cuffdiff. (d) PCRC para los 3 transcritos de ARNm diferentes de Refseq en macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2. Los datos son representativos de tres experimentos (sec-ARN), siete experimentos (análisis de micromatrices) o al menos diez experimentos (PCRC; media y e.e.m.), cada uno de ellos realizado con células derivadas de un donante diferente. * $P < 0,05$ (prueba de la t de Student)

Figura 7: Identificación de nuevos marcadores de polarización de macrófagos basada en un análisis de transcriptoma combinado. Los genes expresados diferencialmente entre los macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 del *surfaceoma* humano (espectro de proteínas humanas de la superficie celular) se observan como mapas cromáticos mediante sec-ARN (panel superior) y análisis de micromatrices (panel inferior). Los datos se normalizaron a puntuación z. La expresión (b-c) de nuevos marcadores de macrófagos se determinó por citometría de flujo (izquierda) de macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 generados en presencia de GM-CSF mostrándose la cuantificación en el gráfico de la derecha. Expresión de (b) CD120b, TLR2 y SLAMF7, así como de (c) CD1a, CD1b, CD93 y CD226. * $P < 0,05$ (prueba de la t de Student). Los números que aparecen en los gráficos indican la intensidad de fluorescencia media. Los datos son representativos de nueve experimentos independientes (b, c; media y e.e.m.) cada uno de ellos realizado con células derivadas de un donante diferente.

Figura 8: Caracterización fenotípica de macrófagos humanos de tipo M1 derivados de monocitos CD14⁺ de sangre periférica. Expresión de marcadores M1 clásicos después de la polarización de macrófagos generados por GM-

CSF con IFN- γ , LPSu, TNF- α o IFN- γ y LPSu. La expresión superficial de los marcadores de linaje CD14 y CD11b, así como la expresión superficial de los marcadores de M1 típicos, CD86 y CD64, se evaluó mediante citometría de flujo.

Figura 9: Comparación de sec-ARN y análisis de micromatrices. Expresión génica en macrófagos de tipo M1 frente a M2 como gráfico de factor de cambio frente a factor de cambio que compara análisis de micromatrices con sec-ARN utilizando solo genes de Refseq expresados diferencialmente en micromatrices.

Figura 10: Análisis de marcadores de macrófagos clásicos. Expresión de (a) CD68, (b) CD64 y (c) CD23 en macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2. Imágenes representativas de lecturas de secuenciación entre genes expresados en macrófagos humanos para los tres donantes analizados. Imágenes extraídas del Visualizador Integrative Genomics (IGV). La altura de las barras representa el número relativo acumulado de lecturas de 100 pb que abarcan una secuencia particular. Los mapas genéticos (parte inferior de cada panel, orientados en dirección 5'-3') están representados por líneas gruesas (exones) y finas (intrones).

Figura 11: Detección de genes de macrófagos clásicos por sec-ARN. Expresión de (a) IL-10 y (b) IL-18 en macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2. Izquierda, expresión determinada por análisis de micromatrices; centro, imágenes representativas de lecturas de secuenciación entre genes expresados en macrófagos humanos. Imágenes extraídas del Visualizador Integrative Genomics (IGV). La altura de las barras representa el número relativo acumulado de lecturas de 100 pb que abarcan una secuencia particular. Los mapas genéticos (parte inferior de cada panel, orientados en dirección 5'-3') están representados por líneas gruesas (exones) y finas (intrones). Derecha, expresión relativa de ARNm por sec-ARN en macrófagos de tipo M1 y de tipo M2. Los datos son representativos de siete (micromatrices, media y d.e.) o tres experimentos (sec-ARN, media y d.e.) cada uno de ellos realizado con células derivadas de un donante diferente. *P <0,05 (prueba de la t de Student), n.s. = no significativo.

Figura 12: Análisis de genes de la familia de apolipoproteína L en macrófagos de tipo M1 y de tipo M2. Expresión de (a) APOL2, (b) APOL3 y (c) APOL6 en macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2. Izquierda, expresión relativa determinada por sec-ARN; centro, imágenes representativas de lecturas de secuenciación entre genes expresados en macrófagos humanos. Imágenes extraídas del Visualizador Integrative Genomics (IGV). La altura de las barras representa el número relativo acumulado de lecturas de 100 pb que abarcan una secuencia particular. Los mapas genéticos (parte inferior de cada panel, orientados en dirección 5'-3') están representados por líneas gruesas (exones) y finas (intrones). Derecha, expresión relativa de ARNm por PCRC en macrófagos de tipo M1 y de tipo M2. Los datos son representativos de tres experimentos (sec-ARN, media y d.e. (desviación estándar) y PCRC, media y e.e.m.) cada uno de ellos realizado con células derivadas de un donante diferente. *P <0,05 (prueba de la t de Student).

Figura 13: Análisis de los genes de la familia de receptores leucocitarios de tipo inmunoglobulina en macrófagos de tipo M1 y de tipo M2. Expresión de (a) LILRA2, (b) LILRA3, (c) LILRA5, (d) LILRB1 y (e) LILRB3 en macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2. Izquierda, expresión relativa determinada por sec-ARN; centro, imágenes representativas de lecturas de secuenciación entre genes expresados en macrófagos humanos. Imágenes extraídas del Visualizador Integrative Genomics (IGV). La altura de las barras representa el número relativo acumulado de lecturas de 100 pb que abarcan una secuencia particular. Los mapas genéticos (parte inferior de cada panel, orientados en dirección 5'-3') están representados por líneas gruesas (exones) y finas (intrones). Derecha, expresión relativa de ARNm por PCRC en macrófagos de tipo M1 y de tipo M2. Los datos son representativos de tres experimentos (sec-ARN, media y d.e. (desviación estándar) y PCRC, media y e.e.m.) cada uno de ellos realizado con células derivadas de un donante diferente. *P <0,05 (prueba de la t de Student).

Figura 14: Identificación de nuevos marcadores de polarización de macrófagos basada en un análisis de transcriptoma combinado. (ab) La expresión de nuevos marcadores de macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 en macrófagos CD11b⁺CD14⁺ se determinó por citometría de flujo (izquierda) de macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 generados en presencia de M-CSF mostrándose la cuantificación en el gráfico de la derecha. Expresión de (a) CD120b, TLR2 y SLAMF7, así como de (b) CD1a, CD1b, CD93 y CD226. *P <0,05 (prueba de la t de Student). Los números que aparecen en los gráficos indican la intensidad de fluorescencia media. Los datos son representativos de nueve experimentos independientes (b, c; media y e.e.m.) cada uno de ellos realizado con células derivadas de un donante diferente.

Descripción detallada de la invención

Los macrófagos son células dinámicas que integran señales de su microambiente para desarrollar respuestas funcionales específicas. El perfil transcripcional basado en micromatrices ha establecido la reprogramación transcripcional como un mecanismo importante para la integración de señales y la función celular de los macrófagos, aunque el conocimiento actual sobre la regulación transcripcional está lejos de ser completo. La secuenciación de ARN (sec-ARN) es ideal para satisfacer esta necesidad, pero también para descubrir nuevos genes marcadores, un área de gran necesidad, particularmente en la biología de los macrófagos humanos. Aplicando sec-ARN, se proporciona un perfil de transcriptoma de alta resolución de macrófagos humanos en condiciones de polarización clásica (tipo M1) y alternativa (tipo M2) y muestra un rango dinámico que supera las observaciones obtenidas con tecnologías anteriores, dando como resulta una comprensión exhaustiva del transcriptoma de macrófagos humanos. Además, en los macrófagos humanos se detectó un uso diferencial de promotores, sitios de inicio de la transcripción alternativos y diferentes secuencias codificantes para 57 locus génicos. Por otra parte, este enfoque condujo a la identificación de nuevos marcadores de superficie celular asociados a M1 (CD120b, TLR2, SLAMF7), así como a M2 (CD1a, CD1b, CD93, CD226).

Debido a la enorme plasticidad de los macrófagos humanos, la clasificación de los estados de polarización basándose en algunos marcadores de superficie celular seguirá siendo un reto sustancial (Murray P.J., Wynn T.A., Nat Rev Immunol. 11(11):723-737 (2011)). En este caso, se abordó cómo los datos de transcriptoma de alta resolución, basados en sec-ARN, podían utilizarse para comprender mejor la biología de la polarización de los macrófagos. Se observó un aumento significativo en el rango dinámico en los datos de sec-ARN que da como resultado un número significativamente más elevado de genes que se determina que se expresan de manera significativamente diferencial. Esto fue cierto a pesar de que se utilizaron siete copias biológicas para el análisis de matrices, pero solo tres muestras para la sec-ARN. Un análisis de redes basado en información inicial confirmaba además que el mayor contenido de información de los datos de sec-ARN descubría aspectos novedosos de la biología de macrófagos, que fue ilustrado por el reconocimiento de la expresión diferencial de numerosos miembros de la familia de dos familias de genes, concretamente, la familia de apolipoproteína L y de receptores leucocitarios de tipo inmunoglobulina. Las APOL constituyen una nueva clase de apolipoproteínas expresadas por macrófagos, ya que sirven como factores líticos contra patógenos invasores, por ejemplo, los tripanosomas africanos inducen la muerte celular programada y también inhiben la infección intracelular por Leishmania (Pays E., Vanhollebeke B., Curr Opin Immunol. 21(5):493-498 (2009); Samanovic M. y col., PLoS Pathog. 5 (1): e1000276 (2009)). Los LILR se han asociado al equilibrio de los efectos de la señalización de receptores de tipo Toll, sugiriendo un papel importante de los LILR tanto en el inicio como en el cese de las respuestas inflamatorias mediadas por macrófagos (Brown D. y col., Tissue Antigens. 64(3):215-225 (2004)). Otro aspecto que mejoraba el conocimiento sobre la biología de la polarización de los macrófagos fue la identificación de varios genes con uso diferencial de promotores y sitios de inicio de la transcripción alternativos, así como variantes de corte empalme diferencial entre macrófagos de tipo M1 y de tipo M2. Como se observa para PDLIM7, una proteína de almacén intracelular que contiene un dominio PDZ y tres dominios LIM vinculados a la señalización mitogénica a través de la organización del citoesqueleto de actina (Nakagawa N. y col., Biochemical and biophysical research communications 272 (2): 505-512 (2000)), que regula la actividad transcripcional de Tbx5 (Camarata T. y col., Developmental biology 337(2):233-245 (2010)), y suprime la actividad de p53 (Jung C.R. y col., The Journal of Clinical Research 120(12):4493-4506 (2010)), reveló, mediante sec-ARN, diferencias significativas en el uso de variantes de corte y empalme para macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 que posiblemente vinculan la regulación de p53 con la polarización de macrófagos (Matas D. y col., Cell death and differentiation 11 (4): 458-467 (2004)). El uso de reacciones de PCRc específicas de variantes de corte y empalme respaldó estos hallazgos, mientras que esta regulación diferencial no se reveló mediante análisis de micromatrices. En total, se detectó el uso del promotor diferencial, el uso del sitio de inicio de la transcripción y el uso de variantes de corte y empalme en más de 50 locus génicos, un número que fue sorprendentemente bajo teniendo en cuenta que dichos mecanismos de regulación transcripcional se han sugerido para la mayoría de los locus génicos en genomas de mamíferos (Kapranov P. y col., Nature reviews Genetics 8(6): 413-423 (2007)).

Si bien los estudios en otros sistemas celulares sugirieron que los datos de sec-ARN mejorarán aún más la caracterización celular (Ozsolak F., Milos P.M., Nature reviews Genetics 12(2):87-98 (2011); Wang Z. y col., Nature reviews Genetics 10 (1): 57-63 (2009); Marioni J.C. y col., Genome Res. 18(9):1509-1517 (2008)), la evaluación directa de la nueva tecnología en la polarización de macrófagos fue necesaria para estimar su posible ganancia de información. Tanto el aumento del rango dinámico como la identificación de transcritos que se perdieron en el análisis de micromatrices, fueron las principales razones del descubrimiento de nuevos genes asociados a la polarización de M1 o M2. No obstante, a pesar de un menor número de transcritos informativos en los datos de micromatrices, el 73 % de la red de M1 principal continuó revelándose, al menos cuando se utilizaban transcritos definidos para enriquecerse en macrófagos de tipo M1. Sin embargo, esta tasa se redujo a solo el 54 % en la red de M2 y en los nodos principales como MYC y TP53 donde solo se revelaron por datos de sec-ARN en macrófagos similares a M2. En general, estos hallazgos apuntan hacia una ventaja de los datos de sec-ARN, cuando el criterio de valoración del análisis es la identificación de nuevos mecanismos biológicos.

Un aspecto importante de la caracterización genómica es la identificación de nuevos genes marcadores en la polarización de macrófagos (Murray P.J., Wynn T.A., Nat Rev Immunol. 11(11):723-737 (2011)). Al centrarse en los genes que forman parte del *surfaceoma* humano, en la mayoría de los casos los datos obtenidos mediante sec-ARN revelaron mayores diferencias entre las células de tipo M1 y de tipo M2 en comparación con los datos obtenidos de los análisis de micromatrices. No obstante, algunos genes solo alcanzaron una expresión diferencial significativa en los datos de matriz, apuntando claramente hacia la necesidad de incluir un número suficientemente grande de copias biológicas también cuando se aplica la sec-ARN. Por otro lado, un subconjunto de genes mostró el conocido efecto de ruido de fondo en los datos de micromatrices, lo que produjo diferencias no significativas entre los dos tipos de células. Independientemente de estas diferentes deficiencias de las dos tecnologías, las diferencias globales entre las dos técnicas en este espacio genético definido fueron menos obvias, lo que sugiere que ambas tecnologías son muy adecuadas para la identificación de marcadores de superficie celular. Considerados en su conjunto, se introdujeron varios genes marcadores nuevos para los cuales se establecieron ensayos de FACS que pueden utilizarse para distinguir entre la polarización de macrófagos M1 y M2 y que pueden combinarse con el análisis de marcadores comunes de macrófagos.

En el procedimiento del aspecto (1) de la invención, la abundancia relativa de los marcadores de superficie celular asociados a M1 es al menos 30 % más elevada en los macrófagos de tipo M1 que en los macrófagos de tipo M2 y la abundancia relativa de los marcadores de superficie celular asociados a M2 es al menos 30 % más elevada en los macrófagos de tipo M2 que en los macrófagos de tipo M1. Se prefiere que la abundancia del marcador de superficie

celular en el macrófago de tipo M1 o M2 respectivo sea al menos 50 % y preferentemente al menos 70 % más alta que en el otro tipo de macrófago.

El uno o más cebadores empleados en la amplificación/resecuenciación empleada en el procedimiento del aspecto (2) de la invención derivan del ácido nucleico marcador respectivo. Preferentemente dichos cebadores tienen al menos 12, más preferentemente al menos 15, más preferentemente al menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia del ácido nucleico marcador respectiva.

De manera similar, la una o más sondas empleadas en el procedimiento del aspecto (3) de la invención derivan del ácido nucleico marcador respectivo. Preferentemente, dichas sondas tienen una longitud que permite una hibridación selectiva con el ácido nucleico marcador. La sonda también puede marcarse con una molécula marcadora adecuada (por ejemplo, con un marcador de fluorescencia) para permitir la detección del complejo sonda-ácido nucleico marcador de superficie resultante.

Dichas sondas también pueden utilizarse en una matriz de hibridación del aspecto (4) de la invención.

Las moléculas de unión utilizadas en el aspecto (5) de la invención incluyen anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales. Por otra parte, dichas moléculas de unión pueden marcarse con moléculas marcadoras, preferentemente marcadores de fluorescencia. Las moléculas de unión particularmente preferidas incluyen los anticuerpos monoclonales CD1b, CD93, CD226 y anti-TLR2 marcados con FITC, CD120b y anti-SLAMF7 marcados con PE y CD1a marcado con PE-Cy5. Además, se prefiere que el procedimiento del aspecto (5), especialmente si se utiliza para aislar los macrófagos de tipo M1 o los macrófagos de tipo M2, se realice en un clasificador FACS (del inglés *Fluorescence-Activated Cell Sorting*, clasificación de células activadas por fluorescencia).

La identificación de nuevos genes marcadores que distinguen a los macrófagos M1 y M2 humanos abre nuevas vías para comprender la biología de los macrófagos polarizados diferencialmente. Uno de los marcadores de M1 identificados en este estudio, concretamente CD120b (TNFR2), se ha relacionado con la supervivencia, la activación e incluso la proliferación celular en otros tipos de células, tales como en linfocitos T (Faustman D., Davis M., *Nat Rev Drug Discov.* 9(6):482-493 (2010)). A diferencia del TNFR1, el TNFR2 conduce preferentemente a la activación de NFkB. Si esto también es cierto en las células mieloides requiere más investigación. Sin embargo, estudios anteriores ya sugirieron que la producción de TNF- α en macrófagos podría interpretarse como un ciclo directo de suministro estabilizador de fenotipo (Popov A. y col., *The Journal of Clinical Research.* 116 (12): 3160-3170 (2006)) y que el TNFR2 podría desempeñar un papel importante en dicho procedimiento.

SLAMF7 se identificó originalmente como una molécula de superficie asociada a linfocitos citolíticos naturales (*NK cell* del inglés *natural killer cell*) (Boles K.S. y col., *Immunol Rev.* 181:234-249 (2001)). Posteriormente, se demostró que se expresaba en linfocitos y monocitos (Murphy J.J. y col., *Biochem J.* 361(Pt 3):431-436 (2002)). Más recientemente, se observó una expresión reducida en monocitos y en linfocitos citolíticos naturales con un aumento simultáneo de SLAMF7 en células B en pacientes con lupus eritematoso (Kim J.R. y col., *Clin Exp Immunol.* 160(3):348-358 (2010)). El vínculo más fuerte con SLAMF7 como gen marcador de M1 proviene de observaciones en el rechazo de aloinjerto intestinal, lo que demuestra que los macrófagos tisulares derivados de pacientes que rechazan el injerto mostraron niveles elevados de SLAMF7 (Ashokkumar C. y col., *Am J Pathol.* 179(4):1929-1938 (2011)). Sería interesante observar si en otros entornos de rechazo de trasplante, los macrófagos también se enriquecen con este nuevo gen marcador M1. Considerando la identificación de genes marcadores específicos únicos para la polarización de macrófagos, nuestros hallazgos apuntan claramente a la necesidad de un análisis multiparamétrico. Esto puede ilustrarse con la expresión diferencial de CD1a y CD1b, dos moléculas de la superficie celular que se estudian principalmente en el contexto de la presentación de antígenos por las células dendríticas (Porcelli S.A., Modlin R.L., *Annu Rev Immunol.* 17:297-329 (1999)). Informes anteriores sugirieron la regulación positiva de proteínas CD1 en monocitos humanos por GM-CSF (Kasinerk W. y col., *J Immunol.* 150(2):579-584 (1993)). Sin embargo, se presentaron pruebas claramente evidentes de que la expresión se induce tanto en los macrófagos impulsados por M-CSF como por GM-CSF, y de que la polarización hacia macrófagos de tipo M2 está aumentando significativamente la expresión de CD1a y CD1b, lo que sugiere que podrían estar regulados positivamente en los macrófagos tisulares en un entorno de activación por M2. Esto es igualmente cierto para CD93, que se identificó originalmente para expresarse en células madre hematopoyéticas tempranas y en células B (Greenlee-Wacker M.C. y col., *Curr Drug Targets.* (2011)). La proteína CD93 participa en procesos biológicos tales como adhesión, migración y fagocitosis (McGreal E.P. y col., *J Immunol.* 168(10):5222-5232 (2002); Nepomuceno R.R. y col., *J Immunol.* 162(6):3583-3589 (1999)). CD93 expresado en células mieloides puede desprenderse de la superficie celular y la forma soluble parece estar implicada en la diferenciación de monocitos hacia un fenotipo de macrófagos (Jeon J.W. y col., *J Immunol.* 185(8):4921-4927 (2010)). Dado que la proteína CD93 soluble se ha implicado en respuestas inflamatorias, será importante aclarar cómo la expresión diferencial de CD93 inducida por polarización contribuye a respuestas inflamatorias específicas. Otro hallazgo sorprendente es la expresión diferencial de CD226 entre macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2, una molécula que inicialmente mostró estar implicada en la función citolítica de los linfocitos T (Shibuya A. y col., *Immunity.* 4(6):573-581 (1996)). Posteriormente, podría demostrarse que CD226 tiene funciones adicionales que incluyen la regulación de la migración de monocitos a través de uniones endoteliales (Reymond N. y col., *J Exp Med.* 199(10): 1331-1341 (2004)). Similar a los otros marcadores asociados a M2, hasta ahora se sabe poco sobre CD226 en macrófagos polarizados. Dado que los niveles de expresión de CD226 en linfocitos se han implicado en enfermedades autoinmunitarias (Sinha S. y col., *PLoS One.* 6 (7): e21868 (2011)) se necesita más investigación para comprender su

papel en el compartimento mielode durante dichos procesos.

En general, al utilizar sec-ARN, se introdujo un análisis de transcriptoma de alta resolución de macrófagos humanos que revela nuevas ideas sobre la polarización de los macrófagos. Si bien los conjuntos de datos de transcriptomas previamente establecidos que abordan la biología de los macrófagos siguen siendo muy adecuados para evaluar importantes cuestiones biológicas y médicas, una comprensión más profunda de la regulación transcripcional durante la polarización de macrófagos requerirá una resolución más alta que es proporcionada por las tecnologías actuales y futuras de sec-ARN. Por otra parte, los nuevos marcadores de la superficie celular ayudarán a comprender mejor los programas y funciones de los macrófagos en las enfermedades humanas.

La invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos.

10 Ejemplos

Materiales y procedimientos

Abreviaturas: LPSu, LPS ultrapuro; PEG, perfil de expresión génica; ACP, análisis de componentes principales; sec-ARN, tecnologías de secuenciación de ARN; IFM, intensidad de fluorescencia media; REAG, red exploradora de asociación de genes; LPKM, Lecturas Por Kilobases del modelo de exón por Millón de lecturas cartografiadas; FC, factor de cambio; SIT, sitios de inicio de la transcripción; SCD, secuencias codificantes.

Aislamiento de células de donantes de sangre sanos: Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se obtuvieron por centrifugación en densidad Pancoll (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania) de capas leucocitarias de donantes sanos obtenidas siguiendo los protocolos aceptados por la junta de revisión institucional de la Universidad de Bonn (voto de ética local n. 045/09). Se proporcionó el consentimiento informado para cada muestra de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Los monocitos CD14⁺ se aislaron de CMSP utilizando perlas MACS específicas de CD14 (Miltenyi Biotec) según el protocolo del fabricante (habitualmente una pureza > 95 %).

Generación de macrófagos: Se cultivaron monocitos CD14⁺ en placas de 6 pocillos en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y se diferenciaron en macrófagos inmaduros utilizando GM-CSF (500 U/ml) o M-CSF (100 U/ml) durante 3 días. El medio que contenía factor de crecimiento se cambió el día 3 y las células se polarizaron durante 3 días con los siguientes estímulos: IFN- γ (200 U/ml), TNF- α (800 U/ml), LPS ultrapuro (LPSu, 10 μ g/ml), IL-4 (1 000 U/ml), IL-13 (100 U/ml), o combinaciones de los mismos (todos de Immunotools, Friesoythe, Alemania).

Anticuerpos monoclonales y citometría de flujo: Las células se tiñeron después de bloqueo con FcR incubando células en PBS con FCS al 20 % durante 10 minutos a 4 °C utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales (todos de Becton Dickinson (BD), BioLegend o eBioscience): CD1b, CD23, CD93, CD226, anti-HLA-DR, anti-TLR2 marcados con FITC; CD64, CD68, CD120b, anti-SLAMF7 marcados con PE; CD1a marcado con PE-Cy5; CD209 marcado con PerCP-Cy5.5; CD86 marcado con APC; CD11b marcado con azul del Pacífico; y CD14 marcado con APC-Cy7 con anticuerpos del mismo isotipo como controles. La tinción intracelular de CD68 se realizó utilizando el kit BD Cytofix/Cytoperm (BD). Los datos se adquirieron en un LSR II (BD) y se analizaron utilizando el programa informático FlowJo (Tree Star). **Aislamiento de ARN:** Se recogieron 5×10^6 - 2×10^7 macrófagos, posteriormente se sometieron a lisis en TRIzol (Invitrogen) y se extrajo el ARN total según el protocolo del fabricante. El ARN precipitado se resolvió en agua sin ARNasa. La calidad del ARN se evaluó midiendo la relación de absorbancia a 260 nm y a 280 nm utilizando un espectrómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), así como visualizando la integridad de la banda de 28S y 18S en un gel de agarosa. **Condiciones de PCR cuantitativa y secuencias de cebadores:** Se retrotranscribieron 500 ng de ARN utilizando el kit de síntesis de ADNc Transcriptor First Strand (Roche Diagnostics). La PCRc se realizó utilizando el kit maestro LightCyclerTaqman con GAPDH como referencia en un LightCycler 480 II (Roche). En la Tabla 2 se resumen las secuencias de cebadores de la PCRc.

La PCR específica de isoforma para identificar acontecimientos de corte y empalme alternativos se realizó utilizando la mezcla maestra para PCR Máxima SYBR Verde/Fluoresceína (Fermentas). El enriquecimiento relativo de cada isoforma en relación con GAPDH se calculó utilizando el procedimiento $2^{-\Delta\Delta CT}$. En la Tabla 3 se enumeran las secuencias de cebadores de la PCRc.

Perfil transcripcional basado en micromatrices y análisis bioinformático de datos de micromatrices: El ARN aislado se purificó adicionalmente utilizando el kit de limpieza de reacción MinElute (Qiagen). Se generó ARNc marcado con biotina utilizando el kit de marcaje de biotina-ARNa TargetAmp Nano-g (Epicentre). El ARNc marcado con biotina se hibridó con microperlas de HT-12V3 humano (Illumina) y se escaneó en un sistema Illumina HiScanSQ. Los datos de intensidad sin procesar se exportaron con BeadStudio 3.1.1.0 (Illumina) y posteriormente se analizaron utilizando R (R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing (2011)). Después de la normalización cuantil, se excluyeron los genes no informativos (coeficiente de variación <0,5). De los conjuntos de datos resultantes, se extrajo una lista de genes con una expresión significativamente diferente en los subtipos de macrófagos. Los genes variables se representaron gráficamente como mapas cromáticos con agrupamiento jerárquico utilizando el coeficiente de correlación como una medida de distancia para las muestras y el promedio de cada grupo para la formación de grupos de los genes. Los valores de expresión se observan con un sombreado que va desde el gris claro (expresión alta) sobre el blanco (expresión intermedia) hasta el gris oscuro (expresión baja). El análisis de componentes principales (ACP) se realizó utilizando el paquete "pcurve" en R. Se puede acceder a los datos de

micromatrices mediante GSE35449.

sec-ARN y análisis de datos: La secuenciación y el análisis se realizaron individualmente en macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 de 3 donantes independientes. El ARN total se transformó en bibliotecas de moléculas de ADNc bicatenario como molde para la secuenciación a alto rendimiento utilizando la estación Illumina CBot y HiScanSQ siguiendo las recomendaciones del fabricante utilizando el kit de preparación de muestras de ARN Illumina TruSeq. Inmediatamente, el ARNm se purificó a partir de 5-10 µg de ARN total utilizando perlas magnéticas unidas al oligo poli-T. La fragmentación se llevó a cabo utilizando cationes divalentes a temperatura elevada en el tampón de fragmentación patentado de Illumina. La primera cadena de ADNc se sintetizó utilizando oligonucleótidos aleatorios y SuperScript II. La síntesis de la segunda cadena de ADNc se realizó posteriormente utilizando ADN polimerasa I y ARNasa H. Los salientes restantes se transformaron en extremos romos mediante actividades de exonucleasa/polimerasa y se eliminaron las enzimas. Después de la adenilación de los extremos 3' de los fragmentos de ADN, los oligonucleótidos adaptadores de Illumina PE se ligaron para preparar la hibridación. Para seleccionar fragmentos de ADNc preferentemente de 200 pb de longitud, los fragmentos de la biblioteca se separaron en un gel de agarosa al 2 % (p/v). La fracción de gel correspondiente para cada biblioteca se escindió y purificó utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen). Los fragmentos de ADN con moléculas adaptadoras ligadas se enriquecieron selectivamente utilizando los cebadores para PCR PE1.0 y PE2.0 de Illumina en una reacción de PCR de 15 ciclos. Los productos se purificaron (kit de purificación por PCR QIAquick) y se cuantificaron utilizando el ensayo de ADN de alta sensibilidad Agilent en un sistema Bioanalyzer 2100 (Agilent). Después de la generación de los grupos, se generaron y analizaron lecturas de 100 pb emparejadas en el extremo utilizando CASAVA 1.8. El alineamiento con el genoma de referencia humano hg19 de UCSC se realizó por etapas. En primer lugar, todas las lecturas que pasaron el filtro de pureza se alinearon con el genoma de referencia. A continuación, las lecturas se alinearon con el transcriptoma de referencia de ARN. Basándose en estas alineaciones, se calculó el número de lecturas que se alineaban con regiones intragénicas o regiones intergénicas, respectivamente. Además, basándose en el archivo de anotación del UCSC, se calculó el número de lecturas que cartografiaban en regiones exónicas e intrónicas así como en sitios de corte y empalme. Utilizando CASAVA 1.8, se establecieron lecturas por kilobase del modelo de exón (LPKM) por millón de lecturas cartografiadas para genes de Refseq. Para identificar lecturas que abarcan acontecimientos de corte y empalme alterados o valores críticos de fusión génica, también se analizaron lecturas utilizando TopHat y Bowtie. Los resultados se procesaron adicionalmente utilizando Cufflinks y Cuffdiff (Trapnell C. y col., Nature biotechnology 28 (5): 511-515 (2010)).

Análisis de redes basado en información inicial utilizando el programa informático REAG: Para observar la conectividad entre los genes en conjuntos de datos de alto rendimiento, se generaron gráficos de redes contextuales basándose en un conocimiento inicial almacenado en las referencias bibliográficas, sobre rutas, interacciones o bases de datos de términos de anotación por REAG (red exploradora de asociación de genes) Paquette J., Tokuyasu T., Bioinformatics 26(2):285-286 (2010). Para observar la regulación transcripcional de genes enriquecidos en M1 respectivamente M2, se usaron datos de matriz y se calcularon las diferencias de factor de cambio utilizando macrófagos no polarizados como comparación. Se observaron genes con un FC > 2 para M1 y con un FC > 1,65 para M2; representados es la red principal. Utilizando la topología de red establecida para macrófagos de tipo M1, se representaron gráficamente los valores de expresión para macrófagos de tipo M2 y viceversa. Para comparar los componentes de las redes y la densidad entre los datos de sec-ARN y de las matrices, la red se observó primero para los datos de sec-ARN (FC > 4 para M1 y FC > 2,5 para M2). Manteniendo la topología de la red, los genes se marcaron según su factor de cambio al visualizar la red basada en la matriz. Los gráficos para genes enriquecidos en M1 respectivamente en M2 se generaron de forma independiente.

Análisis estadístico: Las pruebas de la t de Student se realizaron con el programa informático SPSS 19.0.

Ejemplo 1: Generación de macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2 como un sistema de modelo. Para establecer un transcriptoma de alta resolución de macrófagos humanos como resultado de señales de polarización específicas, como sistema de modelo se utilizó polarización clásica (tipo M1) y alternativa (tipo M2) de macrófagos humanos. Dado que tanto el M-CSF como el GM-CSF se han descrito para diferenciar macrófagos de monocitos CD14⁺ derivados de sangre, primero se compararon los dos estímulos diferentes con respecto a la polarización de los macrófagos y se utilizó la expresión de marcadores de macrófagos bien conocidos como la lectura inicial (Martínez F.O. y col., The Journal of Immunology 177 (10): 7303-7311 (2006); Hamilton J.A., Nat Rev Immunol. 8(7):533-544 (2008)). Para la polarización clásica, se utilizó principalmente IFN-γ como estímulo modelo e IL-4 para la polarización alternativa. Al evaluar el marcador CD11b de la superficie de macrófagos, el porcentaje total de células CD11b⁺ en condiciones de polarización de M1 y M2 fue similar, mientras que la IFM fue ligeramente mayor en macrófagos de tipo M2, independientemente del uso del GM-CSF o del M-CSF (Figura 1a). Adicionalmente, se observó alta expresión de CD14 en todas las células en condiciones de polarización M1 y M2 independientemente de la diferenciación de GM-CSF o M-CSF con una mayor expresión de CD14 en macrófagos de tipo M1 (Figura 1b). En ninguno de los dos marcadores de macrófagos clásicos, CD68 y las moléculas MHC (del complejo principal de histocompatibilidad) de clase II (Figuras 1c y 1d), se observaron diferencias en las cuatro condiciones ensayadas. Cabe destacar que, cuando la señal de IL-4 se proporcionó a los monocitos desde el comienzo del período de diferenciación, se generaron células dendríticas inmaduras con una pérdida típica de marcadores de macrófagos tales como CD14 o CD68 (datos no mostrados). Al evaluar marcadores previamente asociados a la polarización de M1 o M2 (Mantovani A. y col., Trends Immunol. 23(11):549-555 (2002)), se observó una inducción selectiva del marcador CD64 de M1 en macrófagos similares a

M1 en cultivos diferenciados con GM-CSF y M-CSF (Figura 1e), mientras que CD86 solo mostró una expresión específica de M1 en células diferenciadas con GM-CSF (Figura 1f). La evaluación de estos marcadores siguiendo otras señales de polarización asociadas a M1, por ejemplo, LPS, TNF- α o combinaciones de los mismos, produjo resultados comparables (Figura 8). A la inversa, se observó una fuerte inducción del marcador CD23 de M2 en macrófagos polarizados con IL-4 con una inducción significativamente mayor en macrófagos de tipo M2 polarizados con GM-CSF (Figura 1 g). Por lo tanto, para experimentos adicionales, los monocitos se diferenciaron con GM-CSF durante 3 días antes de la polarización con IFN- γ o IL-4 como señales del modelo.

Ejemplo 2: Caracterización de macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 mediante perfilado de expresión génica basado en micromatrices. Más recientemente, se ha sugerido que la evaluación de la polarización de los macrófagos en seres humanos no puede depender únicamente de unos pocos marcadores de la superficie celular, sino que debe adaptarse a los perfiles de expresión génica (Murray P.J., Wynn T.A., *Nature reviews Immunology* 11 (11): 723-737 (2011)). Utilizando una de las generaciones de matrices más recientes, el perfil de expresión génica se realizó en macrófagos no polarizados y polarizados derivados de siete donantes sanos. Para determinar relaciones de muestra, se realizó un ACP (Figura 2a) y un agrupamiento jerárquico (Figura 2b) basándose en genes variables y se mostró segregación de tipo M1, resultados similares a lo que se informó anteriormente para la polarización de M1 (Martínez F.O. y col., *The Journal of Immunology* 177 (10): 7303-7311 (2006)). La visualización con mapas cromáticos de marcadores de macrófagos conocidos de tipo M1 y M2 (Figura 2c) demostró además que los genes que codifican las moléculas de superficie FCGR1A y FCGR1B (representando ambos CD64) y CD86, los genes de citocina/quimiocina CXCL10, CXCL9, IL-1B, IL-6, CXCL11, TNF, IL-23A, y los genes que codifican la proteína intracelular GBP1, aumentaron en macrófagos de tipo M1, resultados similares a lo que se informó anteriormente para la polarización de M1 (Martínez F.O. y col., *The Journal of Immunology* 177 (10): 7303-7311 (2006); Mantovani A. y col., *Immunity* 23(4):344-346 (2005); Mosser D.M., Edwards J.P., *Nat Rev Immunol.* 8(12):958-969 (2008)). A la inversa, los genes asociados a M2 que codifican las moléculas de superficie FCER2 (CD23), IL27RA y CLEC4A, los genes de quimiocina CCL22, CCL18 y CCL17, y la proteína intracelular F13A1 se incrementaron en los macrófagos de tipo M2 (Mantovani A. y col., *Immunity* 23 (4): 344-346 (2005); Mosser D.M., Edwards J.P., *Nat Rev Immunol.* 8(12):958-969 (2008); Wirnsberger G. y col., *Eur J Immunol.* 36(7):1882-1891 (2006)).

Para ilustrar mejor la polarización diferencial de macrófagos, se generaron redes basadas en conocimiento inicial asociadas a M1 (Figura 2d) y a M2 (Figura 2e) aplicando REAG (Paquette J., Tokuyasu T., *Bioinformatics* 26(2):285-286 (2010)) utilizando genes regulados positivamente de manera significativa en células M1 (FC > 2) y M2 (FC > 1,65) polarizadas, respectivamente. Al aplicar valores de expresión a partir de la comparación de macrófagos de tipo M2 con M0 en la red asociada a M1, la gran mayoría de los genes no mostraron cambios ni incluso una reducción en la expresión, probablemente para representar una represión activa de genes asociados a M1 en macrófagos de tipo M2 (Figura 2d). Solo unos pocos genes mostraron un aumento simultáneo en la expresión, y estos genes representaban genes asociados al ciclo celular común. De manera similar, los miembros de la red asociada a M2 no se modificaron ni se redujeron en su mayoría en macrófagos de tipo M1 (Figura 2e).

Ejemplo 3: Aumento de la información global del transcriptoma por sec-ARN. Recientemente se ha sugerido que el perfilado de la expresión génica utilizando micromatrices es inferior a las nuevas tecnologías basadas en secuenciación para proporcionar información sobre el transcriptoma de todo el genoma (Wang Z. y col., *Nature reviews Genetics* 10(1):57-63 (2009)). Para abordar el posible aumento de información para los macrófagos, se realizó sec-ARN en macrófagos de tipo M1 y M2 generados *in vitro*. Después del filtrado de calidad, se obtuvieron $15,0 \pm 2,8$ millones y $20,4 \pm 9,2$ millones de lecturas para las bibliotecas de ADNc de macrófagos de tipo M1 y M2 (Tabla 1). De acuerdo con los datos de sec-ARN obtenidos de otras células eucariotas (Ramskold D. y col., *PLoS computational biology* 5(12):e1000598 (2009)), la mayoría de las lecturas de secuenciación para los macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 se cartografiaron en exones anotados (transcritos Refseq). Las lecturas restantes se cartografiaron en límites de exón-intrón, en intrones o en otras regiones intergénicas no caracterizadas (Tabla 1). Los valores de LPKM son medidas de la abundancia de transcritos individuales en conjuntos de datos de sec-ARN y se ha demostrado que son muy precisos entre múltiples tipos de células (Mortazavi A. y col., *Nature Methods* 5(7):621-628 (2008)). Para asignar las LPKM se utilizó CASAVA. Para comparar los datos de sec-ARN y de micromatrices, se cruzaron datos de sec-ARN y de micromatrices utilizando símbolos del HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Committee*, Comité de Nomenclatura de Genes de la Organización del Genoma Humano). En macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2, se expresaron 11317 y 11466 genes de Refseq aplicando un umbral óptimo previamente definido (LPKM de 0,3) para la expresión génica (Figura 3a) (Ramskold D. y col., *PLoS computational biology* 5(12):e1000598 (2009)). La tasa de éxito actual para genes Refseq para macrófagos de tipo M1 (n = 10155) y de tipo M2 (n = 10418) fue solo ligeramente más baja cuando se utilizaron micromatrices (Figura 3a). Asimismo, cuando los niveles de expresión de ARNm se evalúan a escala global, se observa una alta correlación entre los datos de ARN-sec y de micromatrices similar al de otras células (Mortazavi A. y col., *Nature methods* 5(7):621-628 (2008))- para macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 (Figura 3b).

Ejemplo 4: La sec-ARN revela expresión diferencial a una resolución significativamente más alta. La sec-ARN mostró un rango dinámico significativamente más alto sobre el fondo debido principalmente a niveles de fondo significativamente más bajos. Esto sugirió que la evaluación de la expresión diferencial utilizando sec-ARN podría conducir a una resolución mejorada en comparación con los datos basados en matrices. La aplicación de criterios de filtro estándar (FC $\geq 1,5$, (p < 0,05, LPKM $\geq 0,3$) reveló un total de 1736 genes elevados en macrófagos de tipo M1 frente a los de tipo M2 mediante sec-ARN, mientras que se reconocieron 834 genes mediante análisis de

matrices (Figura 3c). De manera similar, mediante sec-ARN se identificaron 822 genes como elevados en macrófagos de tipo M2 frente a los de tipo M1, mientras que mediante análisis de matrices (Figura 3d), se detectaron 786 genes. Lo que es más importante, cuando se categorizaron los genes expresados diferencialmente según su nivel de expresión diferencial, los datos de sec-ARN revelaron claramente hasta 4 veces más genes con $FC > 4$ para genes asociados a M1 y M2 (Figuras 3c y d), lo que, del mismo modo, era cierto para genes asociados a M1 a niveles más bajos ($1,5 < FC < 4$). Para revelar las posibles razones de esta diferencia a nivel de un solo gen, se utilizó una representación gráfica de FC frente a FC, correlacionando datos basados en sec-ARN y en matrices para genes individuales (Figura 3e). La mayoría de los genes mostraron un comportamiento similar en los experimentos de sec-ARN y micromatrices, aunque las diferencias relativas fueron mayores en los datos obtenidos con sec-ARN (Figura 3e). En su conjunto, se observó un aumento considerable en el rango dinámico de diferencias de factores de cambio en los datos obtenidos por sec-ARN con diferencias que abarcan seis órdenes de magnitud a diferencia de solo cuatro órdenes de magnitud en los datos obtenidos con micromatrices (Figuras 3e y 9). Además, hubo un número significativo de genes que mostraban expresión diferencial en los datos obtenidos con sec-ARN (por ejemplo, DUOX1, DUOX2, TBX21, GBP7), pero no en los datos obtenidos con matrices, lo que sugiere que los datos obtenidos con matrices no son informativos para esta clase de genes. Como se esperaba, cuando se utilizan diagramas de Venn con un límite definido ($-2 \geq FC \geq 2$, ($p < 0,05$, $LPKM \geq 0,3$) para la presentación de datos (Figura 3f), tanto los datos de sec-ARN como los de análisis de matrices revelaron 595 genes que se expresaban diferencialmente, pero la sec-ARN reveló 900 genes adicionales. Sorprendentemente, se clasificaron 308 genes como expresados diferencialmente solo por análisis de matriz (Figura 3f). cuando se evaluaron adicionalmente estos genes, fue evidente que estos genes mostraban una tendencia similar en los datos de sec-ARN pero estas diferencias no llegaron a alcanzar significación estadística (Figura 3 g). En cambio, genes identificados solo mediante sec-ARN, no mostraron claramente diferencias cuando se evaluaron mediante análisis de matriz (Figura 3h). La visualización de genes marcadores típicos como los representados para los datos de matriz en la Figura 2c, demostró una diferenciación comparable de macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 cuando se evaluó mediante sec-ARN (Figura 3i).

Ejemplo 5: Análisis de transcriptoma de resolución de exones de marcadores de macrófagos conocidos. Otra ventaja de la sec-ARN es resolver la expresión génica a nivel de exones (Figura 4). Para los genes CD68 (Figura 4a-d), CD64 (Figura 4e-h) y CD23 (Figura 4i-l) relacionados con macrófagos, los datos de sec-ARN se observaron para los locus genómicos de los genes respectivos y se compararon con datos obtenidos de análisis de matrices, PCRc y FACS. Para CD68, los datos de sec-ARN revelaron una expresión similarmente alta para los macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 para todos los exones con poca variación en los niveles de expresión entre donantes (Figuras 4a y 11). Se observó una variación ligeramente más alta para los datos de micromatrices (Figura 4b) y de PCRc (Figura 4c), mientras que los niveles de proteína mostraron la misma expresión en todas las muestras analizadas (Figura 4d). Para CD64, la sec-ARN reveló ausencia completa de expresión para todos los exones en macrófagos de tipo M2 con alta expresión en macrófagos de tipo M1 (Figura 4e), lo que similarmente se observó con otras tecnologías (Figura 4f-h). Para CD23, los datos de proteínas sugieren una expresión significativamente elevada en los macrófagos de tipo M2 con un nivel de expresión bajo en los macrófagos de tipo M1 (Figura 4i), un resultado que también se observó para los datos de sec-ARN (Figura 4j), así como en los de matriz (Figura 4j) y PCRc (Figura 4k). Se obtuvieron resultados similares para otros genes marcadores (datos no mostrados). Adicionalmente, pudieron detectarse marcadores M1/M2 clásicos no accesibles utilizando micromatrices (Figura 11), lo que sugiere que los datos de alta resolución de sec-ARN están predestinados para la exploración de genes no detectables utilizando micromatrices, de nuevos genes marcadores, así como de principios biológicos de polarización de macrófagos. **Ejemplo 6:** La sec-ARN mejora los análisis basados en redes en macrófagos de tipo M1 y de tipo M2. Para comprender si la sec-ARN también mejoraría la comprensión de los principios biológicos de la polarización de macrófagos, se aplicó análisis de red basado en una información inicial que evalúa el contenido de información de los datos de sec-ARN en comparación con datos de matrices. Los genes expresados a niveles elevados en datos de sec-ARN para M1 ($FC > 4$) se utilizaron para la generación de la red (Figura 5a). Esta red primaria basada en sec-ARN para M1 se utilizó posteriormente para observar la expresión génica basada en matriz (Figura 5b). Cuando se incluyeron genes a un nivel más bajo de expresión diferencial ($FC > 2$), el 73 % de la red se reveló en los datos de matriz y los nodos centrales de la red también se categorizaron como que eran altamente ($FC > 4$) expresados diferencialmente. Sin embargo, solo los datos de sec-ARN revelaron dos grupos de genes de proteínas inmunomoduladoras altamente enriquecidos en la red M1, concretamente la familia de apolipoproteína L (APOL) (Figuras 5a y 12) y de receptores leucocitarios de tipo inmunoglobulina (LILR) (Figuras 5a y 13) (Pays E., Vanhollebeke B., Curr Opin Immunol. 21(5):493-498 (2009); Samanovic M. y col., PLoS Pathog. 5(1):e1000276 (2009); Brown D. y col., Tissue Antigens. 64(3):215-225 (2004)). Como se ilustró para LILRA1 y APOL1, ambos genes se identificaron claramente mediante sec-ARN y RT-PCRc (Figura 5e y f) pero no mediante análisis de micromatrices (datos no mostrados). La aplicación de la red de M2 basada en datos de sec-ARN (Figura 5c) a los datos de la matriz (Figura 5d) reveló solo un 54 % de genes elevados y los principales nodos de la red no se revelaron del todo. Considerados en su conjunto, los datos de sec-ARN enriquecieron claramente la información biológica inicial en la polarización de M1 y M2.

Ejemplo 7: Identificación de variantes de corte y empalme y de quimeras de ARN en macrófagos humanos estimulados diferencialmente. Recientemente se ha sugerido que la diferenciación celular puede dar como resultado el uso de transcritos génicos alternativos o el cambio de isoformas (Trapnell C. y col., Nature biotechnology 28 (5): 511-515 (2010)). Se aplicaron los programas Cufflinks y Cuffdiff para aclarar los cambios en el uso de promotores dominantes, sitios de inicio de transcripción (SIT) y secuencias codificantes (SCD) (Trapnell C. y col., Nature biotechnology 28 (5): 511-515 (2010)). Este análisis reveló 9 genes con promotores alternativos

(Tabla 4), 28 genes que utilizaban SIT alternativos (Tabla 5) y 20 genes con diferentes SCD en macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 (Tabla 6). Se analizó uno de estos genes con mayor detalle. Para el gen que codificaba el dominio 7 PDZ y LIM (enigma) (PDLIM7) se observó un ligero aumento aunque significativo en los macrófagos de tipo M1 para el locus completo en los datos de sec-ARN (Figura 6a), mientras que las sondas en la micromatriz no revelaron cambios significativos (Figura 6b). Proyectos de exploración anteriores sugirieron tres SCD diferentes para PDLIM7. La aplicación de los programas Cufflinks y Cuffdiff a los datos de sec-ARN de M1 y M2 reveló claramente expresión diferencial de SCD individuales (Figura 6c). Mientras que los macrófagos de tipo M1 expresaban principalmente PDLIM7 v1, los macrófagos de tipo M2 expresaban principalmente PDLIM7 v2, mientras que no se observó diferencias para PDLIM7 v4. Se validó el uso de estas variantes por PCRc de versión específica (Figura 6d). Considerados en su conjunto, estos nuevos hallazgos podrían abrir nuevos caminos hacia el papel del corte y empalme alternativo en los macrófagos que posiblemente vinculan el uso de transcritos alternativos con la polarización de los macrófagos.

Ejemplo 8: Nuevos marcadores para macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 identificados por análisis de transcriptoma combinado. A la luz del número aún limitado de marcadores de superficie celular que distinguen claramente los macrófagos humanos de tipo M1 y de tipo M2, se examinaron los genes del *surfaceoma* humano (da Cunha J.P. y col., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(39):16752-16757 (2009)) para determinar la expresión diferencial entre los macrófagos de tipo M1 y los de tipo M2. Mediante este enfoque, se descubrió que 475 moléculas de la superficie se expresaban diferencialmente (Figura 7a). Como se observa en la Figura 7b, las moléculas de superficie celular CD120b, TLR2 y SLAMF7 mostraron expresión preferencial en los macrófagos de tipo M1, lo cual era cierto independientemente de la diferenciación de los macrófagos por GM-CSF o M-CSF (Figura 14a). Varias moléculas de superficie, incluyendo CD1a, CD1b, CD93 y CD226, aumentaron significativamente en cuanto a su expresión en macrófagos de tipo M2 (Figuras 7c y 14b). Considerados en su conjunto, la exploración de datos de transcriptoma de alta resolución establecidos por sec-ARN, permite la identificación de nuevos genes relacionados con programas de polarización específicos en macrófagos.

Tablas

Tabla 1 sec-ARN

	M1		M2	
	lecturas (x10 ⁶)	porcentaje (%)	lecturas (x10 ⁶)	porcentaje (%)
Total	15,0 ± 2,8		20,4 ± 9,2	
Exones	11,8 ± 2,2	78,4 ± 1,1	16,1 ± 7,4	79,4 ± 2,0
Exón-Intrón	0,4 ± 0,1	2,5 ± 0,1	0,5 ± 0,2	2,4 ± 0,2
límites				
Intrones	2,1 ± 0,5	14,1 ± 1,0	2,7 ± 1,3	13,2 ± 1,6
Regiones intergénicas	0,8 ± 0,1	5,0 ± 0,2	1,0 ± 0,5	5,0 ± 0,3

Tabla 2 oligonucleótidos de PCRc

CD68 directo	5'-GTCCACCTCGACCTGCTCT-3'	(SEQ ID NO:15)
CD68 inverso	5'-CACTGGGGCAGGAGAACT-3'	(SEQ ID NO:16)
CD64 directo	5'-TGGGAAAGCATCGCTACAC-3'	(SEQ ID NO:17)
CD64 inverso	5'-GCACTGGAGCTGGAAATAGC-3'	(SEQ ID NO:18)
CD23 directo	5'-GGGAGAATCCAAGCAGGAC-3'	(SEQ ID NO:19)
CD23 inverso	5'-GGAAGCTCCTCGATCTCTGA-3'	(SEQ ID NO:20)
LILRA1 directo	5'-TCGCTGTTTCTACGGTAGCC-3'	(SEQ ID NO:21)
LILRA1 inverso	5'-GGGTGGGTTTGATGTAGGC-3'	(SEQ ID NO:22)
LILRA2 directo	5'-CAGCCACAATCACTCATCAGA-3'	(SEQ ID NO:23)
LILRA2 inverso	5'-AGGGTGGGTTTGCTGTAGG-3'	(SEQ ID NO:24)

(continuación)

Tabla 2 oligonucleótidos de PCRC

LILRA3 directo	5'-GGAGCTCGTGGTCTCAGG-3'	(SEQ ID NO:25)
LILRA3 inverso	5'-CTTGGAGTCGGACTTGTGTTG-3'	(SEQ ID NO:26)
LILRA5 directo	5'-GCACCATGGTCTCATCCAT-3'	(SEQ ID NO:27)
LILRA5 inverso	5'-GTGGCTTTGGAGAGGTTCC-3'	(SEQ ID NO:28)
LILRB1 directo	5'-GGAGCTCGTGGTCTCAGG-3'	(SEQ ID NO:29)
LILRB1 inverso	5'-GGGTTTGATGTAGGCTCCTG-3'	(SEQ ID NO:30)
LILRB3 directo	5'-GGAGATACCGCTGCCACTAT-3'	(SEQ ID NO:31)
LILRB3 inverso	5'-GGTGGGTTTGCTGTAGGC-3'	(SEQ ID NO:32)
APOL1 directo	5'-TTCGAATTCCTCGGTATATCTTG-3'	(SEQ ID NO:33)
APOL1 inverso	5'-CACCTCCAGTTATGCGTCTG-3'	(SEQ ID NO:34)
APOL2 directo	5'-ATGATGAAGCCTGGAATGGA-3'	(SEQ ID NO:35)
APOL2 inverso	5'-TCAGAGCTTTACGGAGCTCAT-3'	(SEQ ID NO:36)
APOL3 directo	5'-GCCTGGAAGAGATTCGTGAC-3'	(SEQ ID NO:37)
APOL3 inverso	5'-CTTCAGAGCTTCGTAGAGAGCA-3'	(SEQ ID NO:38)
APOL6 directo	5'-AAGTGAGGCTGGTGTGGTT-3'	(SEQ ID NO:39)
APOL6 inverso	5'-CGTCTTGCTAGCTCCACGCTT-3'	(SEQ ID NO:40)
GAPDH directo	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	(SEQ ID NO:41)
GAPDH inverso	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	(SEQ ID NO:42)

Tabla 3 Oligonucleótidos de PCRC específicos de isoforma

PDLIM7 v1 directo	5'-CCGCAGCAGAATGGACAG-3'	(SEQ ID NO:43)
PDLIM7 v1 inverso	5'-GCTCCTGGGGTGTAGATG-3'	(SEQ ID NO:44)
PDLIM7 v2 directo	5'-ACCGCAGAAGGTGCAGAC-3'	(SEQ ID NO:45)
PDLIM7 v2 inverso	5'-CTGGCTTGATTTCTTCAGGTG-3'	(SEQ ID NO:46)
PDLIM7 v4 directo	5'-CCGCAGCAGAATGGACAG-3'	(SEQ ID NO:47)
PDLIM7 v4 inverso	5'-GCAGGAGGAACAGAAAGAG-3'	(SEQ ID NO:48)
GAPDH directo	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	(SEQ ID NO:49)
GAPDH inverso	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	(SEQ ID NO:50)

Tabla 4 Uso de promotores alternativos

C8orf83	chr8: 93895757-93978372
EIF4ENIF1	chr22: 31835344-31885874
HRH1	chr3: 11178778-11304939
JDP2	chr14: 75894508-75939404
NCS1	chr9: 132934856-132999583
PDE2A	chr11: 72287184-72385494
PUS7L	chr12: 44122409-44152596
SMARCD3	chr7: 150936058-150974231
TSC22D1	chr13: 45007654-45154568

Tabla 5 Uso de SIT alternativos

WFS1	chr4: 6271576-6304992
ARNT	chr1: 150768686-150849186
ASRGL1	chr11: 62104773-62160887
OSBPL9	chr1: 52082546-52344609
GBA	chr1: 155204238-155214653
HES6	chr2: 239146907-239148681
BAT5	chr6: 31654725-31671137
DCTN1	chr2: 74588280-74621008
RASGRP4	chr19: 38893774-38916945
SNX16	chr8: 82711817-82754521
NDUFC1	chr4: 140211070-140311935
CCDC17	chr1: 46085715-46089731

	(continuación)
CD200R1	chr3: 112641531-112693937
FECH	chr18: 55212072-55253969
NRGN	chr11: 124609828-124617102
RB1CC1	chr8: 53535017-53627026
UBQLN1	chr9: 86274877-86323168
MTERFD3	chr12: 107371068-107380929
MBOAT7	chr19: 54677105-54693733
RANBP3	chr19: 5914192-5978320
RAP1GDS1	chr4: 99182526-99365012
TNNT1	chr19: 55644160-55660606
ABCC1	chr16: 16043433-16236931
CDCA7L	chr7: 21582832-21985542
HYI	chr1: 43888796-43919660
C8orf83	chr8: 93895757-93978372
CD36	chr7: 80231503-80308593
NT5C3	chr7: 33053741-33102409

Tabla 6 Uso de CDS alternativas

ABCC1	chr16: 16043433-16236931
CCDC17	chr1: 46085715-46089731
CD200R1	chr3: 112641531-112693937
CDCA7L	chr7: 21582832-21985542
FECH	chr18: 55212072-55253969
HES6	chr2: 239146907-239148681
HYI	chr1: 43888796-43919660
JDP2	chr14: 75894508-75939404
MYO1B	chr2: 192110106-192290115
NCS1	chr9: 132934856-132999583
PDLIM7	chr5: 176910394-176924602
RANBP3	chr19: 5914192-5978320
RAP1GDS1	chr4: 99182526-99365012
RASGRP4	chr19: 38893774-38916945
RB1CC1	chr8: 53535017-53627026
RP6-213H19.1	chrX: 131157244-131209971
SLC25A45	chr11: 65142662-65150142
SNX16	chr8: 82711817-82754521
TNNT1	chr19: 55644160-55660606
UBQLN1	chr9: 86274877-86323168

Listado de secuencias, Texto libre

SEQ ID NO:	Descripción
1/2	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 1B (CD120b)
3/4	receptor de tipo toll 2 (TLR2)
5/6	miembro de la familia SLAM 7 (SLAMF7)
7/8	CD1a
9/10	CD1b
11/12	CD93
14/15	CD226
16-50	cebador

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Rheinische Friedrich-Wilhelms Universitaet Bonn Becton Dickinson and Company
- <120> Transcriptoma de alta resolución de macrófagos humanos
- <130> 130369wo
- <150> EP 12159479.0

<151> 14/03/2012

<160> 50

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 3682

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

gcgagcgcag	cggagcctgg	agagaaggcg	ctgggctgcg	agggcgcgag	ggcgcgaggg	60
cagggggcaa	ccggaccccg	cccgcaccca	tggcgcccgt	cgccgtctgg	gccgcgctgg	120
ccgtcggact	ggagctctgg	gctgcggcgc	acgccttgcc	cgcccagggtg	gcatttacac	180
cctacgcccc	ggagcccggg	agcacatgcc	ggctcagaga	atactatgac	cagacagctc	240
agatgtgctg	cagcaaatgc	tcgccggggc	aacatgcaaa	agtcttctgt	accaagacct	300
cggacaccgt	gtgtgactcc	tgtgaggaca	gcacatacac	ccagctctgg	aactgggttc	360
ccgagtgcct	gagctgtggc	tcccgctgta	gctctgacca	ggtggaaact	caagcctgca	420
ctcgggaaca	gaaccgcctc	tgcacctgca	ggcccggctg	gtactgcgcg	ctgagcaagc	480
aggagggtg	ccggtgtgct	gcgccgctgc	gcaagtgccg	cccgggcttc	ggcgtggcca	540
gaccaggaac	tgaacatca	gacgtggtgt	gcaagccctg	tgccccgggg	acgttctcca	600
acacgacttc	atccacggat	atttgacagg	cccaccagat	ctgtaacctg	gtggccatcc	660
ctgggaatgc	aagcatggat	gcagtctgca	cgtccacgtc	ccccaccggg	agtatggccc	720
caggggcagt	acacttacct	cagccagtgt	ccacacgata	ccaacacacg	cagccaactc	780
cagaacccag	cactgctcca	agcacctcct	tcctgctccc	aatgggcccc	agccccccag	840
ctgaaggagg	cactggcgac	ttcgctcttc	cagttggact	gattgtgggt	gtgacagcct	900
tgggtctact	aataatagga	gtggtgaact	gtgtcatcat	gaccaggtg	aaaaagaagc	960
ccttgtgcct	gcagagagaa	gccaagggtc	ctcacttgcc	tgccgataag	gcccggggta	1020
cacaggggcc	cgagcagcag	cacctgctga	tcacagcgcc	gagctccagc	agcagctccc	1080
tggagagctc	ggccagtgcg	ttggacagaa	gggcggccac	tcggaaccag	ccacaggcac	1140
caggcgtgga	ggccagtggg	gccggggagg	cccggggccag	caccgggagc	tcagattctt	1200
cccctggtgg	ccatgggacc	caggtcaatg	tcacctgcat	cgtgaacgtc	tgtagcagct	1260

ES 2 745 695 T3

ctgaccacag ctcacagtgc tcctcccaag ccagctccac aatgggagac acagattcca 1320
 gcccctcgga gtccccgaag gacgagcagg tccccttctc caaggaggaa tgtgcctttc 1380
 ggtcacagct ggagacgcca gagaccctgc tggggagcac cgaagagaag cccctgcccc 1440
 ttggagtgcc tgatgctggg atgaagccca gttaaccagg ccggtgtggg ctgtgtcgtgta 1500
 gccaaagtgg gctgagccct ggcaggatga ccctgcgaag gggccctggg ccttccaggc 1560
 ccccaccact aggactctga ggctccttct gggccaagtt cctctagtgc cctccacagc 1620
 cgagcctcc ctctgacctg caggccaaga gcagaggcag cgagttgtgg aaagcctctg 1680
 ctgccatggc gtgtccctct cggaaggctg gctgggcagtg gacgttcggg gcatgctggg 1740
 gcaagtccct gactctctgt gacctgcccc gccagctgc acctgccagc ctggcttctg 1800
 gagcccttgg gttttttgtt tgtttgtttg tttgtttgtt tgtttctccc cctgggctct 1860
 gcccagctc tggcttccag aaaaccccag catccttttc tgcagagggg ctttctggag 1920
 aggagggatg ctgcctgagt caccatgaa gacaggacag tgcttcagcc tgaggctgag 1980
 actgcgggat ggtcctgggg ctctgtgcag ggaggaggtg gcagccctgt agggaacggg 2040
 gtccttcaag ttagctcagg aggcttggaa agcatcacct caggccaggt gcagtggctc 2100
 acgcctatga tcccagcact ttgggaggct gaggcgggtg gatcacctga ggttaggagt 2160
 tcgagaccag cctggccaac atggtaaaac cccatctcta ctaaaaatac agaaattagc 2220
 cgggcgtggg ggcgggcacc tatagtccca gctactcaga agcctgaggc tgggaaatcg 2280
 tttgaacccg ggaagcggag gttgcaggga gccgagatca cgccactgca ctccagcctg 2340
 ggcgacagag cgagagtctg tctcaaaaga aaaaaaaaaag caccgcctcc aaatgccaac 2400
 ttgtcctttt gtaccatggg gtgaaagtca gatgccaga gggcccaggc aggccacat 2460
 attcagtgtc gtggcctggg caagataacg cacttctaac tagaaatctg ccaatttttt 2520
 aaaaaagtaa gtaccactca ggccaacaag ccaacgacaa agccaaactc tgccagccac 2580
 atccaacccc ccacctgcca tttgcaccct ccgccttcac tccggtgtgc ctgcagcccc 2640
 gcgcctcctt ccttgtctgc ctaggccaca ccctctcctt tcagggaatt tcaggaacta 2700
 gagatgactg agtcctcgta gccatctctc tactcctacc tcagcctaga ccctcctcct 2760
 ccccagagg ggtgggttcc tcttccccac tccccacctt caattcctgg gcccacaaacg 2820
 ggctgccctg ccactttggg acatggccag tgtgatccca agtgccagtc ttgtgtctgc 2880
 gtctgtgttg cgtgtcgtgg gtgtgtgtag ccaaggctcg taagttgaat ggcctgcctt 2940
 gaagccactg aagctgggat tcctccccat tagagtcagc cttccccctc ccagggccag 3000
 ggcctgcag aggggaaacc agtgtagcct tgcccggatt ctgggaggaa gcaggttgag 3060
 gggctcctgg aaaggctcag tctcaggagc atggggataa aggagaaggc atgaaattgt 3120

ES 2 745 695 T3

```

ctagcagagc aggggcaggg tgataaattg ttgataaatt ccactggact tgagcttggc 3180
agctgaacta ttggagggtg ggagagccca gccattacca tggagacaag aagggttttc 3240
caccctggaa tcaagatgtc agactggctg gctgcagtga cgtgcacctg tactcaggag 3300
gctgagggga ggatcactgg agcccaggag tttgaggctg cagcgagcta tgatcgcgcc 3360
actacactcc agcctgagca acagagttag accctgtctc tttaaagaaaa aaaaagtcag 3420
actgctggga ctggccaggt ttctgcccac attggaccca catgaggaca tgatggagcg 3480
cacctgcccc ctggttgaca gtcctgggag aacctcaggc ttccttggca tcacagggca 3540
gagccgggaa gcgatgaatt tggagactct gtggggcctt ggttcccttg tgtgtgtgtg 3600
ttgatcccaa gacaatgaaa gtttgcactg tatgctggac ggcattcctg cttatcaata 3660
aacctgtttg ttttaaaaaa aa 3682

```

<210> 2
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

```

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1           5           10           15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
          20           25           30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
          35           40           45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50           55           60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65           70           75           80

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

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
          100          105          110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
          115          120          125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
          130          135          140

```

ES 2 745 695 T3

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
 145 150 155 160
 Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
 165 170 175
 Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190
 Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205
 Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220
 Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240
 Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255
 Asp Phe Ala Leu Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly
 260 265 270
 Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys
 275 280 285
 Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro
 290 295 300
 Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu
 305 310 315 320
 Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser
 325 330 335
 Ala Leu Asp Arg Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly
 340 345 350
 Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser
 355 360 365
 Asp Ser Ser Pro Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile
 370 375 380
 Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln
 385 390 395 400

ES 2 745 695 T3

Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro
405 410 415

Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser
420 425 430

Gln Leu Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro
435 440 445

Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser
450 455 460

<210> 3
<211> 3417
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

cggaggcagc	gagaaagcgc	agccaggcgg	ctgctcggcg	ttctctcagg	tgactgctcg	60
gagttctccc	agtgtttggt	gttgcaagca	ggatccaaag	gagacctata	gtgactccca	120
ggagctctta	gtgaccaagt	gaaggtagct	gtggggctca	ttgtgcccac	tgctctttca	180
ctgctttcaa	ctggtagttg	tgggttgaag	cactggacaa	tgccacatac	tttgtggatg	240
gtgtgggtct	tgggggtcat	catcagcctc	tccaaggaag	aatcctccaa	tcaggcttct	300
ctgtcttgtg	accgcaatgg	tatctgcaag	ggcagctcag	gatctttaaa	ctccattccc	360
tcagggtctc	cagaagctgt	aaaaagcctt	gacctgtcca	acaacaggat	cacctacatt	420
agcaacagtg	acctacagag	gtgtgtgaac	ctccaggctc	tggtgctgac	atccaatgga	480
attaacacaa	tagaggaaga	ttctttttct	tccctgggca	gtcttgaaca	tttagactta	540
tcctataatt	acttatctaa	tttatcgtct	tcctgggttc	agcccctttc	ttctttaaca	600
ttcttaaaact	tactgggaaa	tccttacaaa	accctagggg	aaacatctct	tttttctcat	660
ctcacaaaat	tgcaaatcct	gagagtggga	aatatggaca	ccttcactaa	gattcaaaga	720
aaagattttg	ctggacttac	cttccttgag	gaacttgaga	ttgatgcttc	agatctacag	780
agctatgagc	caaaaagttt	gaagtcaatt	cagaatgtaa	gtcatctgat	ccttcatatg	840
aagcagcata	ttttactgct	ggagattttt	gtagatgtta	caagttccgt	ggaatgtttg	900
gaactgagag	atactgattt	ggacactttc	catttttcag	aactatccac	tggtgaaaca	960
aattcattga	ttaaaaagtt	tacatttaga	aatgtgaaaa	tcaccgatga	aagtttgttt	1020
caggttatga	aacttttgaa	tcagatttct	ggattgttag	aattagagtt	tgatgactgt	1080
acccttaatg	gagttggtaa	ttttagagca	tctgataatg	acagagttat	agatccaggt	1140
aaagtggaaa	cgtaacaat	ccggaggctg	catattccaa	ggttttactt	attttatgat	1200

ES 2 745 695 T3

ctgagcactt	tatattcact	tacagaaaga	gttaaaagaa	tcacagtaga	aaacagtaaa	1260
gtttttctgg	ttccttggtt	actttcacaa	catttaaaat	cattagaata	cttggatctc	1320
agtgaaaatt	tgatgggtga	agaatacttg	aaaaattcag	cctgtgagga	tgctggcccc	1380
tctctacaaa	ctttaatttt	aaggcaaaat	catttggtcat	cattggaaaa	aaccggagag	1440
actttgctca	ctctgaaaaa	cttgactaac	attgatataca	gtaagaatag	ttttcattct	1500
atgcctgaaa	cttgtcagtg	gccagaaaag	atgaaatatt	tgaacttatc	cagcacacga	1560
atacacagtg	taacaggctg	cattcccaag	acactggaaa	ttttagatgt	tagcaacaac	1620
aatctcaatt	tattttcttt	gaatttgccg	caactcaaag	aactttatat	ttccagaaat	1680
aagttgatga	ctctaccaga	tgctccctc	ttacctatgt	tactagtatt	gaaaatcagt	1740
aggaatgcaa	taactacgtt	ttctaaggag	caacttgact	catttcacac	actgaagact	1800
ttggaagctg	gtggcaataa	cttcatttgc	tcctgtgaat	tcctctcctt	cactcaggag	1860
cagcaagcac	tggtccaaagt	cttgattgat	tggtccagcaa	attacctgtg	tgactctcca	1920
tcccatgtgc	gtggccagca	ggttcaggat	gtccgcctct	cggtgtcgga	atgtcacagg	1980
acagcactgg	tgtctggcat	gtgctgtgct	ctgttcctgc	tgatcctgct	cacgggggtc	2040
ctgtgccacc	gtttccatgg	cctgtggtat	atgaaaatga	tgtgggcctg	gctccaggcc	2100
aaaaggaagc	ccaggaaagc	tcccagcagg	aacatctgct	atgatgcatt	tgtttcttac	2160
agtgagcggg	atgcctactg	ggtggagaac	cttatggtcc	aggagctgga	gaacttcaat	2220
cccccttca	agttgtgtct	tcataagcgg	gacttcattc	ctggcaagtg	gatcattgac	2280
aatatcattg	actccattga	aaagagccac	aaaactgtct	ttgtgctttc	tgaaaacttt	2340
gtgaagagtg	agtggtgcaa	gtatgaactg	gacttctccc	atttccgtct	ttttgatgag	2400
aacaatgatg	ctgccattct	cattcttctg	gagcccattg	agaaaaaagc	cattccccag	2460
cgcttctgca	agctgcggaa	gataatgaac	accaagacct	acctggagtg	gcccattggac	2520
gaggctcagc	gggaaggatt	ttgggtaaat	ctgagagctg	cgataaagtc	ctaggttccc	2580
atatttaaga	ccagtctttg	tctagttggg	atctttatgt	cactagttat	agttaagttc	2640
attcagacat	aattatataa	aaactacgtg	gatgtaccgt	catttgagga	cttgcttact	2700
aaaactacaa	aacttcaaat	tttgtctggg	gtgctgtttt	ataaacatat	gccagattta	2760
aaaattgggt	tttggttttt	cttttttcta	tgagataacc	atgatcataa	gtctattact	2820
gatatctgaa	tatagtcctt	tggtatccaa	gggaattggt	tgaggatcc	tcgtggatat	2880
caaaattcat	agatgatcaa	gtcccttata	agagtggcat	agtatttgca	tataacctgt	2940
gtacattctc	ctgtatactt	taaatcatct	ctagattact	tatgataccc	aatacaatgt	3000
aaatactatg	taaatagttg	tactgtcttt	ttatttatat	tattattggt	attttttatt	3060

ES 2 745 695 T3

```

ttcaaaattt ttaaaacata cttttgatcc acagttgggt gacttcatgg atgcagaacc 3120
catggatata gagggccaac tgtaatctgt agcaactggc ttagttcatt aggaaacagc 3180
acaaatgaac ttaagattct caatgactgt gtcattcttt cttcctgcta agagactcct 3240
ctgtggccac aaaaggcatt ctctgtccta cctagctgtc acttctctgt gcagctgac 3300
tcaagagcaa caaggcaaag tatttggggc actcccaaaa acttggtgct attcctagaa 3360
aaaagtgctg tgtatttcct attaaacttt acaggatgag aaaaaaaaaa aaaaaaa 3417

```

<210> 4
 <211> 784
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

```

Met Pro His Thr Leu Trp Met Val Trp Val Leu Gly Val Ile Ile Ser
1          5          10          15

Leu Ser Lys Glu Glu Ser Ser Asn Gln Ala Ser Leu Ser Cys Asp Arg
20          25          30

Asn Gly Ile Cys Lys Gly Ser Ser Gly Ser Leu Asn Ser Ile Pro Ser
35          40          45

Gly Leu Thr Glu Ala Val Lys Ser Leu Asp Leu Ser Asn Asn Arg Ile
50          55          60

Thr Tyr Ile Ser Asn Ser Asp Leu Gln Arg Cys Val Asn Leu Gln Ala
65          70          75          80

Leu Val Leu Thr Ser Asn Gly Ile Asn Thr Ile Glu Glu Asp Ser Phe
85          90          95

Ser Ser Leu Gly Ser Leu Glu His Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Tyr Leu
100         105         110

Ser Asn Leu Ser Ser Ser Trp Phe Lys Pro Leu Ser Ser Leu Thr Phe
115         120         125

Leu Asn Leu Leu Gly Asn Pro Tyr Lys Thr Leu Gly Glu Thr Ser Leu
130         135         140

Phe Ser His Leu Thr Lys Leu Gln Ile Leu Arg Val Gly Asn Met Asp
145         150         155         160

Thr Phe Thr Lys Ile Gln Arg Lys Asp Phe Ala Gly Leu Thr Phe Leu
165         170         175

```

ES 2 745 695 T3

Glu Glu Leu Glu Ile Asp Ala Ser Asp Leu Gln Ser Tyr Glu Pro Lys
 180 185 190

Ser Leu Lys Ser Ile Gln Asn Val Ser His Leu Ile Leu His Met Lys
 195 200 205

Gln His Ile Leu Leu Leu Glu Ile Phe Val Asp Val Thr Ser Ser Val
 210 215 220

Glu Cys Leu Glu Leu Arg Asp Thr Asp Leu Asp Thr Phe His Phe Ser
 225 230 235 240

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

Arg Asn Val Lys Ile Thr Asp Glu Ser Leu Phe Gln Val Met Lys Leu
 260 265 270

Leu Asn Gln Ile Ser Gly Leu Leu Glu Leu Glu Phe Asp Asp Cys Thr
 275 280 285

Leu Asn Gly Val Gly Asn Phe Arg Ala Ser Asp Asn Asp Arg Val Ile
 290 295 300

Asp Pro Gly Lys Val Glu Thr Leu Thr Ile Arg Arg Leu His Ile Pro
 305 310 315 320

Arg Phe Tyr Leu Phe Tyr Asp Leu Ser Thr Leu Tyr Ser Leu Thr Glu
 325 330 335

Arg Val Lys Arg Ile Thr Val Glu Asn Ser Lys Val Phe Leu Val Pro
 340 345 350

Cys Leu Leu Ser Gln His Leu Lys Ser Leu Glu Tyr Leu Asp Leu Ser
 355 360 365

Glu Asn Leu Met Val Glu Glu Tyr Leu Lys Asn Ser Ala Cys Glu Asp
 370 375 380

Ala Trp Pro Ser Leu Gln Thr Leu Ile Leu Arg Gln Asn His Leu Ala
 385 390 395 400

Ser Leu Glu Lys Thr Gly Glu Thr Leu Leu Thr Leu Lys Asn Leu Thr
 405 410 415

Asn Ile Asp Ile Ser Lys Asn Ser Phe His Ser Met Pro Glu Thr Cys
 420 425 430

ES 2 745 695 T3

Gln Trp Pro Glu Lys Met Lys Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Thr Arg Ile
 435 440 445
 His Ser Val Thr Gly Cys Ile Pro Lys Thr Leu Glu Ile Leu Asp Val
 450 455 460
 Ser Asn Asn Asn Leu Asn Leu Phe Ser Leu Asn Leu Pro Gln Leu Lys
 465 470 475 480
 Glu Leu Tyr Ile Ser Arg Asn Lys Leu Met Thr Leu Pro Asp Ala Ser
 485 490 495
 Leu Leu Pro Met Leu Leu Val Leu Lys Ile Ser Arg Asn Ala Ile Thr
 500 505 510
 Thr Phe Ser Lys Glu Gln Leu Asp Ser Phe His Thr Leu Lys Thr Leu
 515 520 525
 Glu Ala Gly Gly Asn Asn Phe Ile Cys Ser Cys Glu Phe Leu Ser Phe
 530 535 540
 Thr Gln Glu Gln Gln Ala Leu Ala Lys Val Leu Ile Asp Trp Pro Ala
 545 550 555 560
 Asn Tyr Leu Cys Asp Ser Pro Ser His Val Arg Gly Gln Gln Val Gln
 565 570 575
 Asp Val Arg Leu Ser Val Ser Glu Cys His Arg Thr Ala Leu Val Ser
 580 585 590
 Gly Met Cys Cys Ala Leu Phe Leu Leu Ile Leu Leu Thr Gly Val Leu
 595 600 605
 Cys His Arg Phe His Gly Leu Trp Tyr Met Lys Met Met Trp Ala Trp
 610 615 620
 Leu Gln Ala Lys Arg Lys Pro Arg Lys Ala Pro Ser Arg Asn Ile Cys
 625 630 635 640
 Tyr Asp Ala Phe Val Ser Tyr Ser Glu Arg Asp Ala Tyr Trp Val Glu
 645 650 655
 Asn Leu Met Val Gln Glu Leu Glu Asn Phe Asn Pro Pro Phe Lys Leu
 660 665 670
 Cys Leu His Lys Arg Asp Phe Ile Pro Gly Lys Trp Ile Ile Asp Asn

ES 2 745 695 T3

675

680

685

Ile Ile Asp Ser Ile Glu Lys Ser His Lys Thr Val Phe Val Leu Ser
690 695 700

Glu Asn Phe Val Lys Ser Glu Trp Cys Lys Tyr Glu Leu Asp Phe Ser
705 710 715 720

His Phe Arg Leu Phe Asp Glu Asn Asn Asp Ala Ala Ile Leu Ile Leu
725 730 735

Leu Glu Pro Ile Glu Lys Lys Ala Ile Pro Gln Arg Phe Cys Lys Leu
740 745 750

Arg Lys Ile Met Asn Thr Lys Thr Tyr Leu Glu Trp Pro Met Asp Glu
755 760 765

Ala Gln Arg Glu Gly Phe Trp Val Asn Leu Arg Ala Ala Ile Lys Ser
770 775 780

<210> 5
<211> 2672
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

```

cttccagaga gcaatatggc tggttcccca acatgcctca ccctcatcta tatectttgg      60
cagctcacag ggtcagcagc ctctggaccc gtgaaagagc tggtcgggtc cgttggtggg      120
gccgtgactt tccccctgaa gtccaaagta aagcaagttg actctattgt ctggaccttc      180
aacacaaccc ctcttgtcac catacagcca gaagggggca ctatcatagt gacccaaaat      240
cgtaaatagg agagagtaga cttcccagat ggaggctact ccctgaagct cagcaaactg      300
aagaagaatg actcagggat ctactatgtg gggatataca gctcatcact ccagcagccc      360
tccacccagg agtacgtgct gcatgtctac gagcacctgt caaagcctaa agtcaccatg      420
ggtctgcaga gcaataagaa tggcacctgt gtgaccaatc tgacatgctg catggaacat      480
ggggaagagg atgtgattta tacctggaag gccctggggc aagcagccaa tgagtcccat      540
aatgggtcca tcctccccat ctcttggaag tggggagaaa gtgatatgac cttcatctgc      600
gttgccagga accctgtcag cagaaacttc tcaagcccca tccttgccag gaagctctgt      660
gaagggtgct ctgatgaccc agattcctcc atggtcctcc tgtgtctcct gttggtgccc      720
ctcctgtcca gtctctttgt actggggcta tttcttttgt ttctgaagag agagagacaa      780
gaagagtaca ttgaagagaa gaagagagtg gacatttgtc gggaaactcc taacatatgc      840
ccccattctg gagagaacac agagtacgac acaatccctc acactaatag aacaatccta      900

```

ES 2 745 695 T3

```

aaggaagatc cagcaaatac ggtttactcc actgtggaaa taccgaaaaa gatggaaaat 960
ccccactcac tgctcacgat gccagacaca ccaaggctat ttgcctatga gaatgttatc 1020
tagacagcag tgcactcccc taagtctctg ctcaaaaaaa aaacaattct cggcccaaag 1080
aaaacaatca gaagaattca ctgatttgac tagaaacatc aaggaagaat gaagaacgtt 1140
gacttttttc caggataaat tatctctgat gcttcttttag atttaagagt tcataattcc 1200
atccactgct gagaaatctc ctcaaaccca gaaggtttaa tcacttcac ccaaaaatgg 1260
gattgtgaat gtcagcaaac cataaaaaaa gtgcttagaa gtattcctat agaaatgtaa 1320
atgcaaggct acacatatta atgacagcct gttgtattaa tgatggctcc aggtcagtgt 1380
ctggagtttc attccatccc agggcttgga tgtaaggatt ataccaagag tcttgctacc 1440
aggagggcaa gaagaccaa acagacagac aagtccagca gaagcagatg cacctgacaa 1500
aaatggatgt attaattggc tctataaact atgtgccag cactatgctg agcttact 1560
aattggctag acgtgctgtc tgccctcatg aaattggctc caaatgaatg aactactttc 1620
atgagcagtt gtagcaggcc tgaccacaga ttcccagagg gccagggtgt gatccacagg 1680
acttgaaggt caaagttcac aaagatgaag aatcagggtg gctgaccatg tttggcagat 1740
actataatgg agacacagaa gtgtgcatgg cccaaggaca aggacctcca gccaggcttc 1800
atztatgcac ttgtgctgca aaagaaaagt ctaggtttta aggtgtgcc agaaccatc 1860
ccaataaaga gaccgagtct gaagtcacat tgtaaactta gtgtaggaga cttggagtca 1920
ggcagtgaga ctggtggggc acggggggca gtgggtactt gtaaaccttt aaagatggtt 1980
aattcattca atagatatatt attaagaacc tatgcgcccc ggcatggtgg ctcacacctg 2040
taatcccagc actttgggag gccaagggtg gtgggtcatc tgaggtcagg agttcaagac 2100
cagcctggcc aacatggtga aaccccatct ctactaaaga tacaaaaatt tgctgagcgt 2160
ggtggtgtgc acctgtaatc ccagctactc gagaggccaa ggcatgagaa tcgcttgaac 2220
ctgggaggtg gaggttgag tgagctgaga tggcaccact gcactccggc ctaggcaacg 2280
agagcaaaac tccaatacaa acaaacaac aaacacctgt gctaggtcag tctggcacgt 2340
aagatgaaca tcctaccaa cacagagctc accatctctt atacttaagt gaaaaacatg 2400
gggaagggga aaggggaatg gctgcttttg atatgttccc tgacacatat cttgaatgga 2460
gacctcccta ccaagtgatg aaagtgttga aaaacttaat acaaatgct tgttgggcaa 2520
gaatgggatt gaggattatc ttctctcaga aaggcattgt gaaggaattg agccagatct 2580
ctctccctac tgcaaaaccc tattgtagta aaaaagtctt ctttactatc ttaataaaac 2640
agatattgtg agattcaaaa aaaaaaaaaa aa 2672

```

<210> 6
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 745 695 T3

<400> 6

```

Met Ala Gly Ser Pro Thr Cys Leu Thr Leu Ile Tyr Ile Leu Trp Gln
1          5          10          15

Leu Thr Gly Ser Ala Ala Ser Gly Pro Val Lys Glu Leu Val Gly Ser
20          25          30

Val Gly Gly Ala Val Thr Phe Pro Leu Lys Ser Lys Val Lys Gln Val
35          40          45

Asp Ser Ile Val Trp Thr Phe Asn Thr Thr Pro Leu Val Thr Ile Gln
50          55          60

Pro Glu Gly Gly Thr Ile Ile Val Thr Gln Asn Arg Asn Arg Glu Arg
65          70          75          80

Val Asp Phe Pro Asp Gly Gly Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Lys Leu Lys
85          90          95

Lys Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Tyr Val Gly Ile Tyr Ser Ser Ser Leu
100         105         110

Gln Gln Pro Ser Thr Gln Glu Tyr Val Leu His Val Tyr Glu His Leu
115         120         125

Ser Lys Pro Lys Val Thr Met Gly Leu Gln Ser Asn Lys Asn Gly Thr
130         135         140

Cys Val Thr Asn Leu Thr Cys Cys Met Glu His Gly Glu Glu Asp Val
145         150         155         160

Ile Tyr Thr Trp Lys Ala Leu Gly Gln Ala Ala Asn Glu Ser His Asn
165         170         175

Gly Ser Ile Leu Pro Ile Ser Trp Arg Trp Gly Glu Ser Asp Met Thr
180         185         190

Phe Ile Cys Val Ala Arg Asn Pro Val Ser Arg Asn Phe Ser Ser Pro
195         200         205

Ile Leu Ala Arg Lys Leu Cys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Asp Ser
210         215         220

Ser Met Val Leu Leu Cys Leu Leu Leu Val Pro Leu Leu Leu Ser Leu
225         230         235         240

```

ES 2 745 695 T3

Phe Val Leu Gly Leu Phe Leu Trp Phe Leu Lys Arg Glu Arg Gln Glu
245 250 255

Glu Tyr Ile Glu Glu Lys Lys Arg Val Asp Ile Cys Arg Glu Thr Pro
260 265 270

Asn Ile Cys Pro His Ser Gly Glu Asn Thr Glu Tyr Asp Thr Ile Pro
275 280 285

His Thr Asn Arg Thr Ile Leu Lys Glu Asp Pro Ala Asn Thr Val Tyr
290 295 300

Ser Thr Val Glu Ile Pro Lys Lys Met Glu Asn Pro His Ser Leu Leu
305 310 315 320

Thr Met Pro Asp Thr Pro Arg Leu Phe Ala Tyr Glu Asn Val Ile
325 330 335

<210> 7
<211> 2111
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 7

gggcagtcgt aggagactct gaaaaagcaa ataatcaat gttaaatacag aaatgtgaat	60
gtagtaaggg gctgaagaga caggggaaga gaatacatgg gaaaatattg aaaaggacag	120
agtgatcaaa aagagcaggg acatgggagc attgggcagc aactgggag ccatttcact	180
ttatgctctt attgtatgat tgagaaaaaa atgtccttag tggttaagtg gcttttcaat	240
gccacatcag acttgttcca tagcagttga attaggggaa ggtgaataag ttggagggtt	300
gtgacaagga gagaagctgg aacagagagg agagtcagaa ccagaggga atgagagact	360
gagtaggcat ctcagggttt ttgaaggagt ggattttctt tgttcagtc aggggaggtt	420
tgtctgttgg ctgcagaaag aagtcagaat agagatatcg tgggtaggt ttgtttgaa	480
cagaaatcaa agaccaattt ttctgagaga aggaaataac atctgcaa atgatgctgt	540
ttttgctact tccattgtta gctgttctcc caggatgatg caatgcagac gggctcaagg	600
agcctctctc cttccatgtc acctggatcg catcctttta caaccattcc tggaaacaaa	660
atctggtctc aggttggctg agtgatttgc agactcatac ctgggacagc aattccagca	720
ccatcgtttt cctgtgcccc tgggtccagg gaaacttcag caatgaggag tgggaaggaa	780
tggaaacatt attccgtata cgcaccattc ggtcatttga gggaattcgt agatacgccc	840
atgaattgca gtttgaatat ccttttgaga tacagggtgac aggaggctgt gagctgcact	900
ctggaaaggt ctcaggaagc ttcttgagc tagcttatca aggatcagac tttgtgagct	960

ES 2 745 695 T3

```

tccagaacaa ttcattggtg ccatatccag tggctgggaa tatggccaag cttttctgca 1020
aagtgtctcaa tcagaatcag catgaaaatg acataacaca caatcttctc agtgacacct 1080
gcccacgttt catcttgggt cttcttgatg caggaaaggc acatctccag cggcaagtga 1140
agcccgaggc ctggctgtcc catggcccca gtcctggccc tggccatctg cagcttgtgt 1200
gccatgtctc aggattctac ccaaagcccg tgtgggtgat gtggatgcgg ggtgagcagg 1260
agcagcaggg cactcagcga ggggacatct tgcccagtgc tgatgggaca tggatatctc 1320
gcgcaaccct ggaggtggcc gctggggagg cagctgacct gtcctgtcgg gtgaagcaca 1380
gcagtctaga gggccaggac atcgtcctct actgggagca tcacagttcc gtgggcttca 1440
tcatcttggc ggtgatagtg cctttacttc ttctgatagg tcttgcgctt tggttcagga 1500
aacgtgttt ctgttaagac acaccatgag cctcctcgtc acccttctcc ttttggggtg 1560
agagaccagc agcccaaggg ctccagacac acctgaacac atcgtgatga tgacgtcctc 1620
tcaactctct ttgtaaaaat tttgttattt ttgcttgttt ctgattaatg attgtttgtc 1680
aatataagct caatttaatt ttgcaggatt tgttgttctg acctgggttc tgggactttt 1740
aaattcaaat tttatctcca gatggaatgg ggtcctagca acctccacat gttcaactat 1800
taatggatca tcaggcctgt tttagatata ccttactcca gagggccttc cctgacttac 1860
aagtgggaag cagtctcttc ctggtctgaa ctcccgcac attttagccg tactttgcta 1920
actgtgctcc tcacttcctc ttcttcattg cagttattta gatccccctt ttccttctaa 1980
tttttcagct ccttcaatgc aaagtacatg tatttttaat atatgcatcc ctggtgaagg 2040
atcttgcttg catgaaacat gttctcaata aaactctgtg ttgaatttat gccaaaaaaa 2100
aaaaaaaaa a 2111

```

<210> 8
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 8

```

Met Leu Phe Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ala Val Leu Pro Gly Asp Gly
1           5           10           15

Asn Ala Asp Gly Leu Lys Glu Pro Leu Ser Phe His Val Thr Trp Ile
                20           25           30

Ala Ser Phe Tyr Asn His Ser Trp Lys Gln Asn Leu Val Ser Gly Trp
                35           40           45

Leu Ser Asp Leu Gln Thr His Thr Trp Asp Ser Asn Ser Ser Thr Ile
50           55           60

```

ES 2 745 695 T3

Val Phe Leu Cys Pro Trp Ser Arg Gly Asn Phe Ser Asn Glu Glu Trp
 65 70 75 80
 Lys Glu Leu Glu Thr Leu Phe Arg Ile Arg Thr Ile Arg Ser Phe Glu
 85 90 95
 Gly Ile Arg Arg Tyr Ala His Glu Leu Gln Phe Glu Tyr Pro Phe Glu
 100 105 110
 Ile Gln Val Thr Gly Gly Cys Glu Leu His Ser Gly Lys Val Ser Gly
 115 120 125
 Ser Phe Leu Gln Leu Ala Tyr Gln Gly Ser Asp Phe Val Ser Phe Gln
 130 135 140
 Asn Asn Ser Trp Leu Pro Tyr Pro Val Ala Gly Asn Met Ala Lys His
 145 150 155 160
 Phe Cys Lys Val Leu Asn Gln Asn Gln His Glu Asn Asp Ile Thr His
 165 170 175
 Asn Leu Leu Ser Asp Thr Cys Pro Arg Phe Ile Leu Gly Leu Leu Asp
 180 185 190
 Ala Gly Lys Ala His Leu Gln Arg Gln Val Lys Pro Glu Ala Trp Leu
 195 200 205
 Ser His Gly Pro Ser Pro Gly Pro Gly His Leu Gln Leu Val Cys His
 210 215 220
 Val Ser Gly Phe Tyr Pro Lys Pro Val Trp Val Met Trp Met Arg Gly
 225 230 235 240
 Glu Gln Glu Gln Gln Gly Thr Gln Arg Gly Asp Ile Leu Pro Ser Ala
 245 250 255
 Asp Gly Thr Trp Tyr Leu Arg Ala Thr Leu Glu Val Ala Ala Gly Glu
 260 265 270
 Ala Ala Asp Leu Ser Cys Arg Val Lys His Ser Ser Leu Glu Gly Gln
 275 280 285
 Asp Ile Val Leu Tyr Trp Glu His His Ser Ser Val Gly Phe Ile Ile
 290 295 300
 Leu Ala Val Ile Val Pro Leu Leu Leu Leu Ile Gly Leu Ala Leu Trp

ES 2 745 695 T3

305

310

315

320

Phe Arg Lys Arg Cys Phe Cys
325

<210> 9
<211> 1396
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 9

5

```

ggcagttgga agagagaaga agtcactaca ggggtactgag gaaaagcttt gctgaaattg      60
gagatcaaat accagctctg ccagtaagaa gttgcatctc ccagtgaaat gctgctgctg      120
ccatttcaac tgtagctgt tctctttcct ggtggttaaca gtgaacatgc cttccagggg      180
ccgacctcct ttcattgttat ccgacctcgt tcctttacca atagtacctg ggcacaaact      240
caaggctcag gctggttgga tgatttgcag attcatggct gggatagcga ctcaggcact      300
gccatattcc tgaagccttg gtctaaagggt aacttttagtg ataaggaggt tgctgagtta      360
gaggagatat tccgagtcta catctttgga ttcgctcgag aagtacaaga ctttgccgggt      420
gatttccaga tgaataaccc ctttgagatc cagggcatag caggctgtga gctacattct      480
ggagggtgcc tagtaagctt cctgagggga gctctaggag gattggattt cctgagtgtc      540
aagaatgctt catgtgtgcc ttcccagaa ggtggcagca gggcacagaa attctgtgca      600
ctaatcatac aatatcaagg tatcatggaa actgtgagaa ttctcctcta tgaaacctgc      660
ccccgatatc tcttgggcgt cctcaatgca ggaaaagcag atctgcaaag acaagtgaag      720
cctgaggcct ggctgtccag tggccccagt cctggacctg gccgtctgca gcttgtgtgc      780
catgtctcag gattctacct aaagcccgtg tgggtgatgt ggatgcgggg tgagcaggag      840
cagcagggca ctcagctagg ggacatcctg cccaatgcta actggacatg gtatctccga      900
gcaaccctgg atgtggcaga tggggaggcg gctggcctgt cctgtcgggt gaagcacagc      960
agtttagagg gccaggacat catcctctac tggagaaacc ccacctccat tggctcaatt     1020
gttttgccaa taatagtgcc ttccttgctc cttttgctat gccttgcatl atggtatatg     1080
aggcgccggg catatcagaa tatcccatga gccatcatca tgtctcctct cccattcgca     1140
ataagtacca agaagcccaa gatatcagcc caaaagtcaa tcttatcata tttcaaataa     1200
ttttcaaatt tgatgaaatc agagttttca tgtattttta aataaattat tatttaaaca     1260
tcagcaaaaa agtacttaaa actgtaaatt tattatgaga ctgtactaac agtgtgattc     1320
accctgattt tacacacatt aaaatgtag aaaaaatgtg tctcaaaata aatgaaatat     1380
aatacatatg acttaa                                     1396

```

<210> 10
<211> 333
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

ES 2 745 695 T3

<400> 10

```

Met Leu Leu Leu Pro Phe Gln Leu Leu Ala Val Leu Phe Pro Gly Gly
 1      5      10      15

Asn Ser Glu His Ala Phe Gln Gly Pro Thr Ser Phe His Val Ile Gln
 20      25      30

Thr Ser Ser Phe Thr Asn Ser Thr Trp Ala Gln Thr Gln Gly Ser Gly
 35      40      45

Trp Leu Asp Asp Leu Gln Ile His Gly Trp Asp Ser Asp Ser Gly Thr
 50      55      60

Ala Ile Phe Leu Lys Pro Trp Ser Lys Gly Asn Phe Ser Asp Lys Glu
 65      70      75      80

Val Ala Glu Leu Glu Glu Ile Phe Arg Val Tyr Ile Phe Gly Phe Ala
 85      90      95

Arg Glu Val Gln Asp Phe Ala Gly Asp Phe Gln Met Lys Tyr Pro Phe
100      105      110

Glu Ile Gln Gly Ile Ala Gly Cys Glu Leu His Ser Gly Gly Ala Ile
115      120      125

Val Ser Phe Leu Arg Gly Ala Leu Gly Gly Leu Asp Phe Leu Ser Val
130      135      140

Lys Asn Ala Ser Cys Val Pro Ser Pro Glu Gly Gly Ser Arg Ala Gln
145      150      155      160

Lys Phe Cys Ala Leu Ile Ile Gln Tyr Gln Gly Ile Met Glu Thr Val
165      170      175

Arg Ile Leu Leu Tyr Glu Thr Cys Pro Arg Tyr Leu Leu Gly Val Leu
180      185      190

Asn Ala Gly Lys Ala Asp Leu Gln Arg Gln Val Lys Pro Glu Ala Trp
195      200      205

Leu Ser Ser Gly Pro Ser Pro Gly Pro Gly Arg Leu Gln Leu Val Cys
210      215      220

His Val Ser Gly Phe Tyr Pro Lys Pro Val Trp Val Met Trp Met Arg

```

ES 2 745 695 T3

225		230		235		240
Gly Glu Gln Glu Gln Gln Gly Thr Gln Leu Gly Asp Ile Leu Pro Asn						
		245		250		255
Ala Asn Trp Thr Trp Tyr Leu Arg Ala Thr Leu Asp Val Ala Asp Gly						
		260		265		270
Glu Ala Ala Gly Leu Ser Cys Arg Val Lys His Ser Ser Leu Glu Gly						
		275		280		285
Gln Asp Ile Ile Leu Tyr Trp Arg Asn Pro Thr Ser Ile Gly Ser Ile						
		290		295		300
Val Leu Ala Ile Ile Val Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Cys Leu Ala						
		305		310		315
						320
Leu Trp Tyr Met Arg Arg Arg Ser Tyr Gln Asn Ile Pro						
		325		330		

<210> 11
 <211> 6701
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 11

aaagccctca gcctttgtgt ccttctctgc gccggagtgg ctgcagctca cccctcagct	60
ccccttgggg cccagctggg agccgagata gaagctcctg tcgcoctgg gcttctcgcc	120
tcccgagag ggccacacag agaccgggat ggccacctcc atgggcctgc tgctgctgct	180
gctgctgctc ctgacctcagc ccggggcggg gacgggagct gacacggagg cgggtggtctg	240
cgtggggacc gcctgctaca cggcccactc gggcaagctg agcgtgccg agggccagaa	300
ccactgcaac cagaacgggg gcaacctggc cactgtgaag agcaaggagg agggccagca	360
cgtccagcga gtactggccc agctcctgag gcgggaggca gccctgacgg cgaggatgag	420
caagttctgg attgggctcc agcgagagaa gggcaagtgc ctggacccta gtctgccgct	480
gaagggcttc agctgggtgg gcggggggga ggacacgcct tactctaact ggcacaagga	540
gctccggaac tcgtgcatct ccaagcgctg tgtgtctctg ctgctggacc tgtcccagcc	600
gctccttccc agccgcctcc ccaagtggtc tgaggggccc tgtgggagcc caggctcccc	660
cggaagtaac attgagggtc tcgtgtgcaa gttcagcttc aaaggcatgt gccggcctct	720
ggccctgggg ggcccaggtc aggtgacctc caccaccccc ttccagacca ccagttcctc	780
cttgagggtc gtgccctttg cctctgcggc caatgtagcc tgtggggaag gtgacaagga	840
cgagactcag agtcattatt tcctgtgcaa ggagaaggcc cccgatgtgt tcgactgggg	900

ES 2 745 695 T3

cagctcgggc cccctctgtg tcagcccca gtatggctgc aacttcaaca atgggggctg 960
 ccaccaggac tgctttgaag ggggggatgg ctcccttcctc tgcggctgcc gaccaggatt 1020
 ccggctgctg gatgacctgg tgacctgtgc ctctcgaaac ccttgacagct ccagcccatg 1080
 tcgtgggggg gccacgtgcg tcctgggacc ccatgggaaa aactacacgt gccgctgccc 1140
 ccaagggtac cagctggact cgagtcagct ggactgtgtg gacgtggatg aatgccagga 1200
 ctccccctgt gcccaggagt gtgtcaacac ccctgggggc ttccgctgcg aatgctgggt 1260
 tggctatgag ccgggcggtc ctggagaggg ggctgtcag gatgtggatg agtgtgctct 1320
 gggctcgtcg ccttgcgccc agggctgcac caacacagat ggctcatttc actgctcctg 1380
 tgaggagggc tacgtcctgg ccggggagga cgggactcag tgccaggacg tggatgagtg 1440
 tgtgggcccg gggggcccc tctgcgacag cttgtgcttc aacacacaag ggtccttcca 1500
 ctgtggctgc ctgccaggct ggggtgctggc cccaaatggg gtctcttgca ccatggggcc 1560
 tgtgtctctg ggaccaccat ctgggcccc cgatgaggag gacaaaggag agaaagaagg 1620
 gagcacogtg ccccgctgtg caacagccag tcccacaagg gggcccgagg gcacccccaa 1680
 ggctacaccc accacaagta gaccttcgct gtcatctgac gccccatca catctgcccc 1740
 actcaagatg ctggccccca gtgggtcccc aggcgtctgg agggagccca gcatccatca 1800
 cgccacagct gcctctggcc ccaggagcc tgcagggtgg gactcctccg tggccacaca 1860
 aaacaacgat ggactgacg ggcaaaagct gcttttattc tacatcctag gcaccgtggt 1920
 ggccatccta ctctgctgg ccctggctct ggggctactg gtctatcgca agcggagagc 1980
 gaagagggag gagaagaagg agaagaagcc ccagaatgcg gcagacagtt actcctgggt 2040
 tccagagcga gctgagagca gggccatgga gaaccagtac agtccgacac ctgggacaga 2100
 ctgctgaaag tgaggtggcc ctagagacac tagagtcacc agccaccatc ctgagagctt 2160
 tgaactcccc attccaaagg ggcaccaca tttttttgaa agactggact ggaatcttag 2220
 caaacaattg taagtctcct ccttaaaggc cccttggaac atgcaggtat tttctacggg 2280
 tgtttgatgt tcctgaagtg gaagctgtgt gttggcgtgc cacgggtggg atttcgtgac 2340
 tctataatga ttgttactcc ccctcccttt tcaaattcca atgtgaccaa ttccggatca 2400
 ggggtgtgagg aggccggggc taaggggctc ccctgaatat cttctctgct cacttccacc 2460
 atctaagagg aaaaggtgag ttgctcatgc tgattaggat tgaaatgatt tgtttctctt 2520
 cctaggatga aaactaaatc aattaattat tcaattaggt aagaagatct ggtttttttg 2580
 tcaaagggaa catgttcgga ctggaaacat ttctttacat ttgcattcct ccatttcgcc 2640
 agcacaagtc ttgctaaatg tgatactgtt gacatcctcc agaatggcca gaagtgcaat 2700
 taacctctta ggtggcaagg aggcaggaag tgcctcttta gttcttacct ttctaatagc 2760
 cttgggttta tttgcaaagg aagcttgaaa aatatgagaa aagttgcttg aagtgcatta 2820

ES 2 745 695 T3

caggtgtttg tgaagtcaca taatctacgg ggctagggcg agagaggcca gggatttgtt 2880
 cacagatact tgaattaatt catccaaatg tactgagggt accacacact tgactacgga 2940
 tgtgatcaac actaacaagg aaacaaattc aaggacaacc tgtctttgag ccagggcagg 3000
 cctcagacac cctgcctgtg gccccgcctc cacttcatcc tgcccggaat gccagtgtc 3060
 cgagctcaga cagaggaagc cctgcagaaa gttccatcag gctgtttcct aaaggatgtg 3120
 tgaacgggag atgatgcact gtgttttgaa agttgtcatt tttaaagcatt ttagcacagt 3180
 tcatagtcca cagttgatgc agcatcctga gattttaaat cctgaagtgt ggggtggcgca 3240
 cacaccaagt agggagctag tcaggcagtt tgcttaagga acttttgttc tctgtctctt 3300
 ttccttaaaa ttgggggtaa ggaggggaagg aagagggaaa gagatgacta actaaaatca 3360
 tttttacagc aaaaactgct caaagccatt taaattatat cctcatttta aaagttacat 3420
 ttgcaaatat ttctccctat gataatgtag tcgatagtgt gcactctttc tctctctctc 3480
 tctctctcac acacacacac acacacacac acacacacac agagacacgg caccattctg 3540
 cctggggcac tggaacacat tcctgggggt caccgatggg cagagtcact agaagttacc 3600
 tgagtatctc tgggaggcct catgtctcct gtgggctttt taccaccact gtgcaggaga 3660
 acagacagag gaaatgtgtc tccctccaag gccccaaagc ctcagagaaa ggggtgttct 3720
 ggttttgcct tagcaatgca tcggtctctg aggtgacact ctggagtggg tgaagggcca 3780
 caagggtcag ggttaatact cttgccagtt ttgaaatata gatgctatgg ttcagattgt 3840
 ttttaataga aaactaaagg ggcaggggaa gtgaaaggaa agatggagggt tttgtgcggc 3900
 tcgatggggc atttggaact tctttttaaa gtcattctcat ggtctccagt tttcagttgg 3960
 aactctggtg ttttaacactt aaggagaca aaggctgtgt ccatttggca aaacttcctt 4020
 ggccacgaga ctctaggtga tgtgtgaagc tgggcagtct gtggtgtgga gagcagccat 4080
 ctgtctggcc attcagagga ttctaaagac atggctggat gcgctgctga ccaacatcag 4140
 cacttaaata aatgcaaagc caacatttct ccctctgggc cttgaaaatc cttgccctta 4200
 tcatttgggg tgaaggagac atttctgtcc ttggcttccc acagcccaa cgcagtctgt 4260
 gtatgattcc tgggatccaa cgagccctcc tattttcaca gtgttctgat tgctctcaca 4320
 gccagggccc atcgtctgtt ctctgaatgc agccctgttc tcaacaacag ggaggtcatg 4380
 gaaccctct gtggaacca caaggggaga aatgggtgat aaagaatcca gttcctcaa 4440
 accttcctg gcaggctggg tccctctcct gctgggtggg gctttctctt gcacaccact 4500
 cccaccacgg ggggagagcc agcaacccaa ccagacagct caggtttgtc atctgatgga 4560
 aaccactggg ctcaaacacg tgctttattc tcctgtttat ttttgctgtt actttgaagc 4620
 atggaaattc ttgtttgggg gatcttgggg ctacagtagt gggtaaacaa atgccaccg 4680

ES 2 745 695 T3

gccaaagaggc cattaacaaa tcgtccttgt cctgaggggc cccagcttgc tcgggcgtgg 4740
 cacagtgggg aatccaaggg tcacagtatg gggagaggtg caccctgcc aatgctaact 4800
 tctcgctaga cacagtgttt ctgcccaggt gacctgttca gcagcagaac aagccagggc 4860
 catggggacg ggggaagttt tcacttgag atggacacca agacaatgaa gatttgttgt 4920
 ccaaataaggc caataattct gggagactct tggaaaaaac tgaatatatt caggaccaac 4980
 tctctccctc ccctcatccc acatctcaaa gcagacaatg taaagagaga acatctcaca 5040
 caccagctc gccatgccta ctcatctctg aatttcaggt gccatcactg ctctttcttt 5100
 cttctttgtc atttgagaaa ggatgcagga ggacaattcc cacagataat ctgaggaatg 5160
 cagaaaaacc agggcaggac agttatcgac aatgcattag aacttggtga gcatcctctg 5220
 tagagggact ccaccctgc tcaacagctt ggcttccagg caagaccaac cacatctggt 5280
 ctctgccttc ggtggccac acacctaagc gtcacgtca ttgccatagc atcatgatgc 5340
 aacacatcta cgtgtagcac tacgacgtta tgtttgggta atgtggggat gaactgcatg 5400
 aggctctgat taaggatgtg gggaaagtgg ctgcggtcac tgtcggcctt gcaaggccac 5460
 ctggaggcct gtctgttagc cagtgggtga ggagcaaggc ttcaggaagg gccagccaca 5520
 tgccatcttc cctgcgatca ggcaaaaaag tggaattaa aagtcaaacc tttatatgca 5580
 tgtgttatgt ccattttgca ggatgaactg agtttaaaag aatttttttt tctcttcaag 5640
 ttgctttgtc ttttccatcc tcatcacaag cccttgtttg agtgtcttat ccctgagcaa 5700
 tctttcgatg gatggagatg atcattaggt acttttgttt caacctttat tcctgtaaat 5760
 atttctgtga aaactaggag aacagagatg agatttgaca aaaaaaatt gaattaaaaa 5820
 taacacagtc tttttaaaac taacatagga aagcctttcc tattatttct cttcttagct 5880
 tctccattgt ctaaatcagg aaaacaggaa aacacagctt tctagcagct gcaaaatggt 5940
 ttaatgcccc ctacatattt ccatcacctt gaacaatagc tttagcttgg gaatctgaga 6000
 tatgatccca gaaaacatct gtctctactt cggctgcaaa acccatggtt taaatctata 6060
 tggtttgtgc attttctcaa ctaaaaatag agatgataat ccgaattctc catatattca 6120
 ctaatcaaag acactatttt catactagat tcctgagaca aatactcact gaagggcttg 6180
 tttaaaaata aattgtgttt tggctctgtc ttgtagataa tgcccttcta ttttaggtag 6240
 aagctctgga atccctttat tgtgctgttg ctcttatctg caagggtggca agcagttctt 6300
 ttcagcagat tttgcccact attcctctga gctgaagttc tttgcataga tttggcttaa 6360
 gcttgaatta gatccctgca aaggcttgct ctgtgatgtc agatgtaatt gtaaatgtca 6420
 gtaatcactt catgaatgct aatgagaat gtaagtattt ttaaatgtgt gtatttcaaa 6480
 tttgtttgac taattctgga attacaagat ttctatgcag gatttacctt catcctgtgc 6540
 atgtttccca aactgtgagg aggggaaggc cagagatcga gcttctctc tgagttctaa 6600

ES 2 745 695 T3

caaaatgggtg ctttgagggt cagccttttag gaagggtgcag ctttgttgtc ctttgagctt 6660
tctgttatgt gcctatccta ataaactctt aaacacattg a 6701

<210> 12
<211> 652
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 12

5

Met	Ala	Thr	Ser	Met	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	1	5	10	15
Gln	Pro	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	Asp	Thr	Glu	Ala	Val	Val	Cys	Val	20	25	30	
Gly	Thr	Ala	Cys	Tyr	Thr	Ala	His	Ser	Gly	Lys	Leu	Ser	Ala	Ala	Glu	35	40	45	
Ala	Gln	Asn	His	Cys	Asn	Gln	Asn	Gly	Gly	Asn	Leu	Ala	Thr	Val	Lys	50	55	60	
Ser	Lys	Glu	Glu	Ala	Gln	His	Val	Gln	Arg	Val	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	65	70	75	80
Arg	Arg	Glu	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	Arg	Met	Ser	Lys	Phe	Trp	Ile	Gly	85	90	95	
Leu	Gln	Arg	Glu	Lys	Gly	Lys	Cys	Leu	Asp	Pro	Ser	Leu	Pro	Leu	Lys	100	105	110	
Gly	Phe	Ser	Trp	Val	Gly	Gly	Gly	Glu	Asp	Thr	Pro	Tyr	Ser	Asn	Trp	115	120	125	
His	Lys	Glu	Leu	Arg	Asn	Ser	Cys	Ile	Ser	Lys	Arg	Cys	Val	Ser	Leu	130	135	140	
Leu	Leu	Asp	Leu	Ser	Gln	Pro	Leu	Leu	Pro	Ser	Arg	Leu	Pro	Lys	Trp	145	150	155	160
Ser	Glu	Gly	Pro	Cys	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Asn	Ile	Glu	165	170	175	
Gly	Phe	Val	Cys	Lys	Phe	Ser	Phe	Lys	Gly	Met	Cys	Arg	Pro	Leu	Ala	180	185	190	
Leu	Gly	Gly	Pro	Gly	Gln	Val	Thr	Tyr	Thr	Thr	Pro	Phe	Gln	Thr	Thr	195	200	205	

ES 2 745 695 T3

Ser Ser Ser Leu Glu Ala Val Pro Phe Ala Ser Ala Ala Asn Val Ala
 210 215 220
 Cys Gly Glu Gly Asp Lys Asp Glu Thr Gln Ser His Tyr Phe Leu Cys
 225 230 235 240
 Lys Glu Lys Ala Pro Asp Val Phe Asp Trp Gly Ser Ser Gly Pro Leu
 245 250 255
 Cys Val Ser Pro Lys Tyr Gly Cys Asn Phe Asn Asn Gly Gly Cys His
 260 265 270
 Gln Asp Cys Phe Glu Gly Gly Asp Gly Ser Phe Leu Cys Gly Cys Arg
 275 280 285
 Pro Gly Phe Arg Leu Leu Asp Asp Leu Val Thr Cys Ala Ser Arg Asn
 290 295 300
 Pro Cys Ser Ser Ser Pro Cys Arg Gly Gly Ala Thr Cys Val Leu Gly
 305 310 315 320
 Pro His Gly Lys Asn Tyr Thr Cys Arg Cys Pro Gln Gly Tyr Gln Leu
 325 330 335
 Asp Ser Ser Gln Leu Asp Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Gln Asp Ser
 340 345 350
 Pro Cys Ala Gln Glu Cys Val Asn Thr Pro Gly Gly Phe Arg Cys Glu
 355 360 365
 Cys Trp Val Gly Tyr Glu Pro Gly Gly Pro Gly Glu Gly Ala Cys Gln
 370 375 380
 Asp Val Asp Glu Cys Ala Leu Gly Arg Ser Pro Cys Ala Gln Gly Cys
 385 390 395 400
 Thr Asn Thr Asp Gly Ser Phe His Cys Ser Cys Glu Glu Gly Tyr Val
 405 410 415
 Leu Ala Gly Glu Asp Gly Thr Gln Cys Gln Asp Val Asp Glu Cys Val
 420 425 430
 Gly Pro Gly Gly Pro Leu Cys Asp Ser Leu Cys Phe Asn Thr Gln Gly
 435 440 445
 Ser Phe His Cys Gly Cys Leu Pro Gly Trp Val Leu Ala Pro Asn Gly

ES 2 745 695 T3

450		455		460
Val Ser Cys Thr Met Gly Pro Val Ser Leu Gly Pro Pro Ser Gly Pro				
465		470		475
				480
Pro Asp Glu Glu Asp Lys Gly Glu Lys Glu Gly Ser Thr Val Pro Arg				
		485		490
				495
Ala Ala Thr Ala Ser Pro Thr Arg Gly Pro Glu Gly Thr Pro Lys Ala				
		500		505
				510
Thr Pro Thr Thr Ser Arg Pro Ser Leu Ser Ser Asp Ala Pro Ile Thr				
		515		520
				525
Ser Ala Pro Leu Lys Met Leu Ala Pro Ser Gly Ser Pro Gly Val Trp				
		530		535
				540
Arg Glu Pro Ser Ile His His Ala Thr Ala Ala Ser Gly Pro Gln Glu				
		545		550
				555
Pro Ala Gly Gly Asp Ser Ser Val Ala Thr Gln Asn Asn Asp Gly Thr				
		565		570
				575
Asp Gly Gln Lys Leu Leu Leu Phe Tyr Ile Leu Gly Thr Val Val Ala				
		580		585
				590
Ile Leu Leu Leu Leu Ala Leu Ala Leu Gly Leu Leu Val Tyr Arg Lys				
		595		600
				605
Arg Arg Ala Lys Arg Glu Glu Lys Lys Glu Lys Lys Pro Gln Asn Ala				
		610		615
				620
Ala Asp Ser Tyr Ser Trp Val Pro Glu Arg Ala Glu Ser Arg Ala Met				
		625		630
				635
Glu Asn Gln Tyr Ser Pro Thr Pro Gly Thr Asp Cys				
		645		650

<210> 13
 <211> 2664
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 13

gctatctgag gaagttctgg tagagagaag agctcaagag catgggcaga gtcagctcct	60
gagtgggctg aacgctcccc tcagctcctg cagtgctaataaagggaggg agcagcgggg	120
agcttgacgt gaccaagagg gtgttgaggc taggaggcca cgataaacag gatacgataa	180

ES 2 745 695 T3

aagtccttaa ccaagacgca gatgggaaga agcgttagag cgagcagcac tcacatctca	240
agaaccagcc tttcaaacag tttccagaga tggattatcc tactttactt ttggctcttc	300
ttcatgtata cagagctcta tgtgaagagg tgctttggca tacatcagtt ccctttgccg	360
agaacatgtc tctagaatgt gtgtatccat caatgggcat cttaacacag gtggagtggg	420
tcaagatcgg gaccacgag gattccatag ccattttcag ccctactcat ggcattgtca	480
taaggaagcc ctatgctgag agggtttact ttttgaattc aacgatggct tccaataaca	540
tgactctttt ctttcggaat gcctctgaag atgatgttgg ctactattcc tgctctcttt	600
acacttacct acagggaact tggcagaagg tgatacagg gtgtcagtca gatagttttg	660
aggcagctgt gccatcaa atgccacattg tttcggaaac tggaaagaat gtcacactca	720
cttgtcagcc tcagatgacg tggcctgtgc aggcagtgag gtgggaaaag atccagcccc	780
gtcagatcga cctcttaact tactgcaact tgggtccatgg cagaaatttc acctccaagt	840
tcccaagaca aatagtgagc aactgcagcc acggaagggtg gagcgtcatc gtcacccccg	900
atgtcacagt ctcagactcg gggctttacc gctgctactt gcaggccagc gcaggagaaa	960
acgaaacctt cgtgatgaga ttgactgtag ccgagggtaa aaccgataac caatataccc	1020
tctttgtggc tggagggaca gttttattgt tgttgtttgt tatctcaatt accaccatca	1080
ttgtcatttt ccttaacaga aggagaagga gagagagaag agatctattt acagagtcct	1140
gggatacaca gaaggcaccc aataactata gaagtcccat ctctaccagt caacctacca	1200
atcaatccat ggatgataca agagaggata tttatgtcaa ctatccaacc ttctctcgca	1260
gaccaaagac tagagtttaa gcttattctt gacatgagtg cattagtaat gactcttatg	1320
tactcatgca tggatcttta tgcaattttt ttccactacc caagggtctac cttagatact	1380
agttgtctga attgagttac tttgatagga aaaatacttc attacctaaa atcatttttc	1440
atagaactgt ttcagaaaac ctgactctaa ctgggtttata taaaaagaa aacttactgt	1500
atcatataac agaattgatcc aggggagatt aagctttggg caagggtat ttaccagggc	1560
ttaaattgtg tgtctagaat taagtatggg cataaactgg cttctgaatc cttttccaga	1620
gtgttggatc catttccttg gtcttggcct cactctcatg caggctttcc tcttgtgttg	1680
gcaagatggc tgccaactct tggcaattca tacatccttg tttctgtctg gtagagagtt	1740
tgcttctcaa atggagcaaa caaatttgat tattttttca ttgttaaata ggcaacatga	1800
ccagaaagga tggaaatggc taagtaaact aagggttcac ttctagagct gagaagcagg	1860
gtcaaagcac aatactgggc aattcagagc atgggttagaa gaggaagggt gagtctcaaa	1920
gctggagagt ttaccaacaa atattgactg cagtgattaa ccaagacatt tttgttaact	1980
aaaaagtga atattgggatg gattctagaa atggggtatc tctgtccata cttctagaat	2040
ccactctatc agcatagtcc agaagaatac ctggcagtag aagaaatgaa tattcaagag	2100

ES 2 745 695 T3

```

gaagataaat gcgagagggc aatcctttac tattctcata tttatttatc tctcattctg 2160
tatagaattc ttgccgccat cccaggtcta gccttaggag caaatgtagt agatagtcga 2220
ataataaata acttaatgtt ttggacatat ttgtctact ttgagaatt atttttaata 2280
tgtaaattct ctcaaaaggg tcaggcacct agttattatt ttttaatgat tatgtgaaag 2340
ttgaatataa tataaccacta aaagtgcacg ttgaaagtgg tggcatagga tggtagggta 2400
gaaatttggg agggaaaaaa gaaattggga gggtagcaggc aacaggagaa aggaatcaaa 2460
ccacagaaaa atacaaaggg aaacttctgc ttcactattc agacaaagac agccctaata 2520
acatcaccaa cagtcaaagc aattagagac catacctaata attgtttaaa ttctagatgt 2580
aggctaacaa tgaaaagtat ttgccaaact gaataaaact gtcattggta ccttgaaaaa 2640
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2664

```

<210> 14
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14

5

```

Met Asp Tyr Pro Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu His Val Tyr Arg Ala
1          5          10          15

Leu Cys Glu Glu Val Leu Trp His Thr Ser Val Pro Phe Ala Glu Asn
          20          25          30

Met Ser Leu Glu Cys Val Tyr Pro Ser Met Gly Ile Leu Thr Gln Val
          35          40          45

Glu Trp Phe Lys Ile Gly Thr Gln Gln Asp Ser Ile Ala Ile Phe Ser
50          55          60

Pro Thr His Gly Met Val Ile Arg Lys Pro Tyr Ala Glu Arg Val Tyr
65          70          75          80

Phe Leu Asn Ser Thr Met Ala Ser Asn Asn Met Thr Leu Phe Phe Arg
          85          90          95

Asn Ala Ser Glu Asp Asp Val Gly Tyr Tyr Ser Cys Ser Leu Tyr Thr
          100          105          110

Tyr Pro Gln Gly Thr Trp Gln Lys Val Ile Gln Val Val Gln Ser Asp
          115          120          125

Ser Phe Glu Ala Ala Val Pro Ser Asn Ser His Ile Val Ser Glu Pro
          130          135          140

```

ES 2 745 695 T3

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

<210> 15
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cebador

<400> 15
 gtccacctcg acctgctct

19

10

<210> 16
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> cebador

<400> 16

ES 2 745 695 T3

	cactggggca ggagaaact	19
	<210> 17	
	<211> 19	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 17	
10	tgggaaagca tcgctacac	19
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador	
	<400> 18	
	gcactggagc tggaaatagc	20
	<210> 19	
20	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 19	
25	gggagaatcc aagcaggac	19
	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 20	
	ggaagctcct cgatctctga	20
35	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
40	<400> 21	
	tcgctgtttc tacggtagcc	20
	<210> 22	
	<211> 19	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 22	
	gggtgggttt gatgtaggc	19
50	<210> 23	

	<211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> cebador	
	<400> 23 cagccacaat cactcatcag a	21
10	<210> 24 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
15	<400> 24 agggtgggtt tgctgtagg	19
	<210> 25 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 25 ggagctcgtg gtctcagg	18
25	<210> 26 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
30	<400> 26 cttgagtcg gactgtttt g	21
	<210> 27 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador	
	<400> 27 gcacatggt ctcacat	19
40	<210> 28 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador	
	<400> 28 gtggctttgg agaggtcc	19
50	<210> 29 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	

ES 2 745 695 T3

	<220> <223> cebador	
	<400> 29 ggagctcgtg gtctcagg	18
5	<210> 30 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 30 gggttgatg taggctcctg	20
15	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
20	<400> 31 ggagataccg ctgccactat	20
	<210> 32 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> cebador	
	<400> 32 ggtgggttg ctgtaggc	18
30	<210> 33 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
35	<400> 33 ttcgaattcc tcggtatatc ttg	23
	<210> 34 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador	
	<400> 34 cacctccagt tatgcgtctg	20
45	<210> 35 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> cebador	

ES 2 745 695 T3

	<400> 35 atgatgaagc ctggaatgga	20
5	<210> 36 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
10	<400> 36 tcagagcttt acggagctca t	21
15	<210> 37 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
20	<400> 37 gcctggaaga gattcgtgac	20
25	<210> 38 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
30	<400> 38 cttcagagct tcgtagagag ca	22
35	<210> 39 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
40	<400> 39 aagtgaggct ggtgttggt	20
45	<210> 40 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
50	<400> 40 cgtctttag ctccacgtct t	21
	<210> 41 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador	
	<400> 41 agccacatcg ctacagacac	19

ES 2 745 695 T3

	<210> 42 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> cebador	
	<400> 42 gcccaatacg accaaatcc	19
10	<210> 43 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
15	<400> 43 ccgcagcaga atggacag	18
20	<210> 44 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 44 gctcctgggg tgtagatg	18
25	<210> 45 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
	<400> 45 accgcagaag gtgcagac	18
35	<210> 46 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
40	<400> 46 ctggcttgat ttctcaggt g	21
45	<210> 47 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 47 ccgcagcaga atggacag	18
50	<210> 48 <211> 19 <212> ADN	

ES 2 745 695 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 48 gcaggaggaacagaaagag	19
	<210> 49	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 49 agccacatcg ctcagacac	19
15	<210> 50	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
20	<400> 50 gcccaatacg accaaatcc	19

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para identificar, distinguir entre y aislar macrófagos de tipo M1 y de tipo M2, que comprende la caracterización de macrófagos en función del nivel de expresión de uno o más de los marcadores de superficie celular específicos asociados a M1 CD120b que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1, TLR2 que
5 tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 3 y SLAMF7 que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 5, o de uno o más de los marcadores de superficie celular específicos asociados a M2 CD1a que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 7, CD1b que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 9, CD93 que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 11 y CD226 que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 13, respectivamente, en el que el nivel de expresión de los marcadores de superficie celular
10 asociados a M1 es al menos 30 % más elevado en los macrófagos de tipo M1 que en los macrófagos de tipo M2 y el nivel de expresión de los marcadores de superficie celular asociados a M2 es al menos 30 % más elevado en los macrófagos de tipo M2 que en macrófagos de tipo M1.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el nivel de expresión del marcador de superficie celular en los macrófagos de tipo M1 o de tipo M2 es al menos 50 % y preferentemente al menos 70 % más elevado que en el otro
15 tipo de macrófagos.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la identificación de y la distinción entre los macrófagos de tipo M1 y de tipo M2 se realiza mediante una amplificación o mediante una resecuenciación dirigida de uno o más de los ácidos nucleicos marcadores de superficie celular específicos asociados a M1 CD120b, TLR2 y SLAMF7 (SEQ ID NO: 1, 3 y 5), o de uno o más de los ácidos nucleicos marcadores de superficie específicos asociados a M2 CD1a, CD1b, CD93 y CD226 (SEQ ID NO: 7, 9, 11 y 13), respectivamente, del macrófago, y de una detección posterior del producto de amplificación/resecuenciación.
20
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la amplificación/resecuenciación emplea uno o más cebadores derivados de cada uno de los ácidos nucleicos marcadores, preferentemente dichos cebadores tienen al menos 12, preferentemente al menos 15, más preferentemente al menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia del ácido
25 nucleico marcador respectiva.
5. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la identificación de y la distinción entre los macrófagos de tipo M1 y de tipo M2, comprende hibridar una o más sondas selectivas para uno de los ácidos nucleicos marcadores de superficie celular específicos asociados a M1 CD120b, TLR2 y SLAMF7 (SEQ ID NO: 1, 3 y 5), o para uno de los ácidos nucleicos marcadores de superficie celular específicos asociados a M2 CD1a, CD1b, CD93 y CD226 (SEQ ID NO: 7, 9, 11 y 13), respectivamente, del macrófago.
30
6. El procedimiento de la reivindicación 5, que se realiza en una matriz de hibridación.
7. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la identificación de, la distinción entre y el aislamiento de los macrófagos de tipo M1 y de tipo M2, comprende poner en contacto los macrófagos con una o más moléculas de unión dirigidas contra las proteínas marcadoras de superficie celular específicas asociadas a M1 CD120b, TLR2 y SLAMF7 (SEQ ID NO: 2, 4 y 6), o con una o más moléculas de unión dirigidas contra las proteínas marcadoras de superficie celular asociadas a M2 específicas CD1a, CD1b, CD93 y CD226 (SEQ ID NO: 8, 10, 12 y 14), respectivamente.
35
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que las moléculas de unión
 - (i) son anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales; y/o
 - (ii) están marcadas con moléculas marcadoras, preferentemente marcadores de fluorescencia.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que las moléculas de unión se seleccionan de los CD1b, CD93, CD226 y anti-TLR2 marcados con FITC; CD120b y anti-SLAMF7 marcados con PE y anticuerpos monoclonales CD1a marcado con PE-Cy5.
40
10. El procedimiento según una o más de las reivindicaciones 7 a 9, que se realiza en un clasificador FACS.
11. Uso de un kit para realizar el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, kit que comprende al menos un reactivo para identificar, distinguir entre y aislar macrófagos de tipo M1 y al menos un reactivo para identificar, distinguir entre y aislar macrófagos de tipo M2, seleccionándose dichos reactivos de
45
 - (i) uno o más cebadores derivados de los ácidos nucleicos marcadores como se define en la reivindicación 4,
 - (ii) una o más sondas selectivas para los ácidos nucleicos marcadores de superficie celular como se define en la reivindicación 5,
 - (iii) una matriz de hibridación como se define en la reivindicación 6, o
 - (iv) una o más moléculas de unión como se define en las reivindicaciones 7 a 9.
12. Uso de anticuerpos seleccionados de anticuerpos dirigidos contra CD120b que tienen la secuencia proteica de la SEQ ID NO: 2, anticuerpos dirigidos contra TLR2 que tienen la secuencia proteica de la SEQ ID NO: 4 y anticuerpos dirigidos contra SLAMF7 que tienen la secuencia proteica de la SEQ ID NO: 6, para realizar el procedimiento según
50

una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que los anticuerpos son para identificar, caracterizar y aislar macrófagos de tipo M1.

- 5 13. Uso de anticuerpos seleccionados de anticuerpos dirigidos contra CD1a que tienen la secuencia proteica de la SEQ ID NO: 8, anticuerpos dirigidos contra CD1b que tienen la secuencia proteica de la SEC ID NO: 10, anticuerpos dirigidos contra CD93 que tienen la secuencia proteica de la SEQ ID NO: 12 y anticuerpos dirigidos contra CD226 que tienen la secuencia proteica de la SEQ ID NO: 14, para realizar el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que los anticuerpos son para identificar, caracterizar y aislar macrófagos de tipo M2.

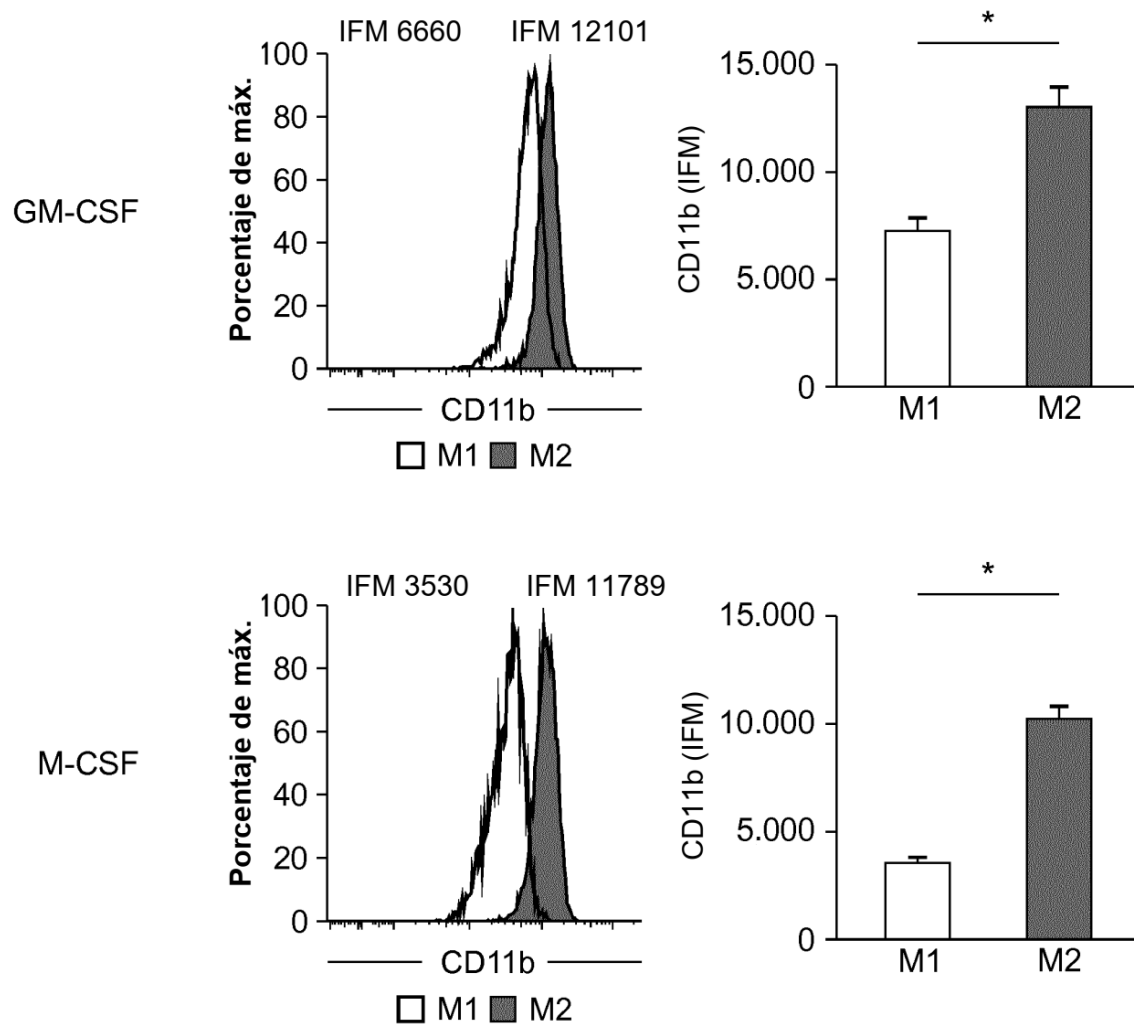


Fig.1a

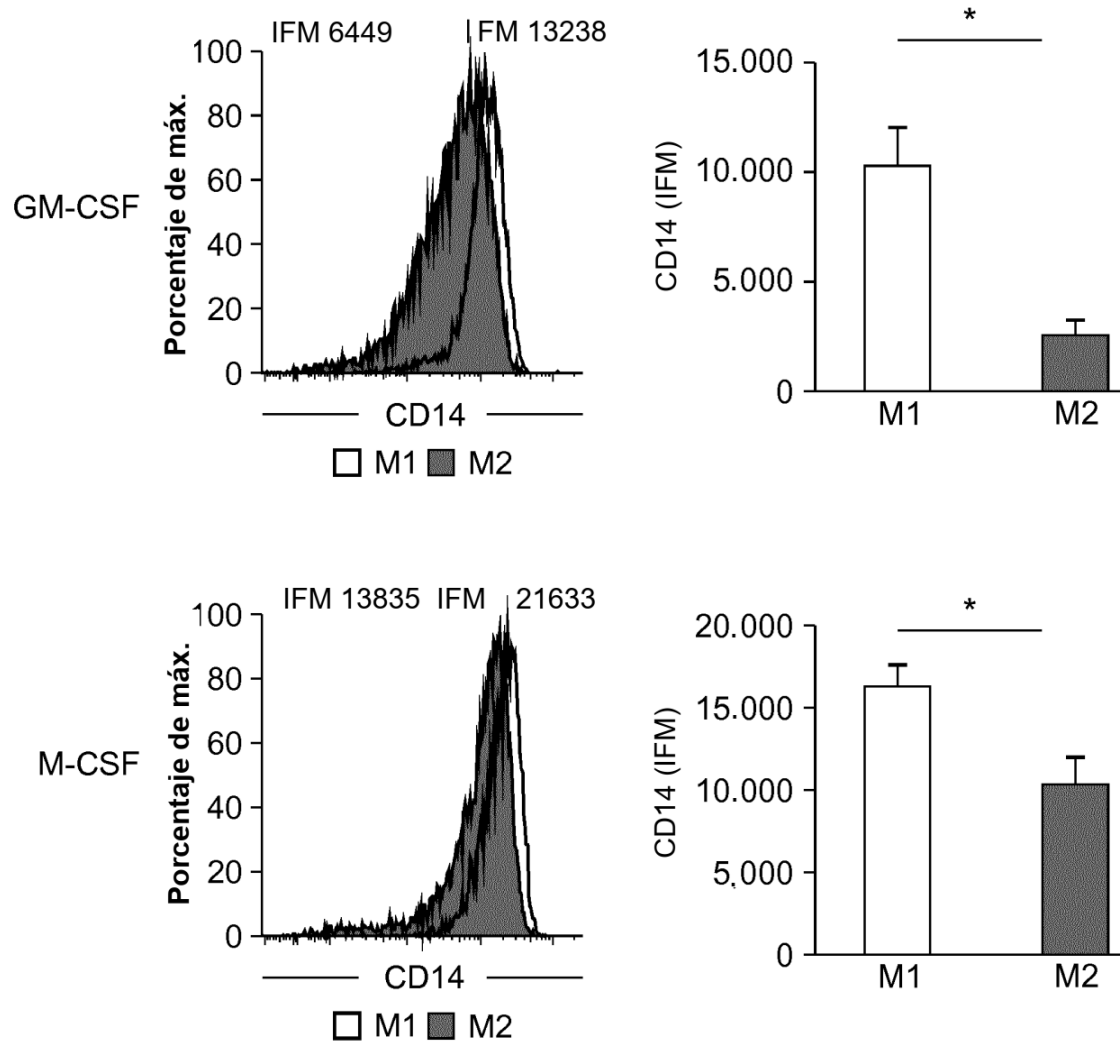


Fig.1b

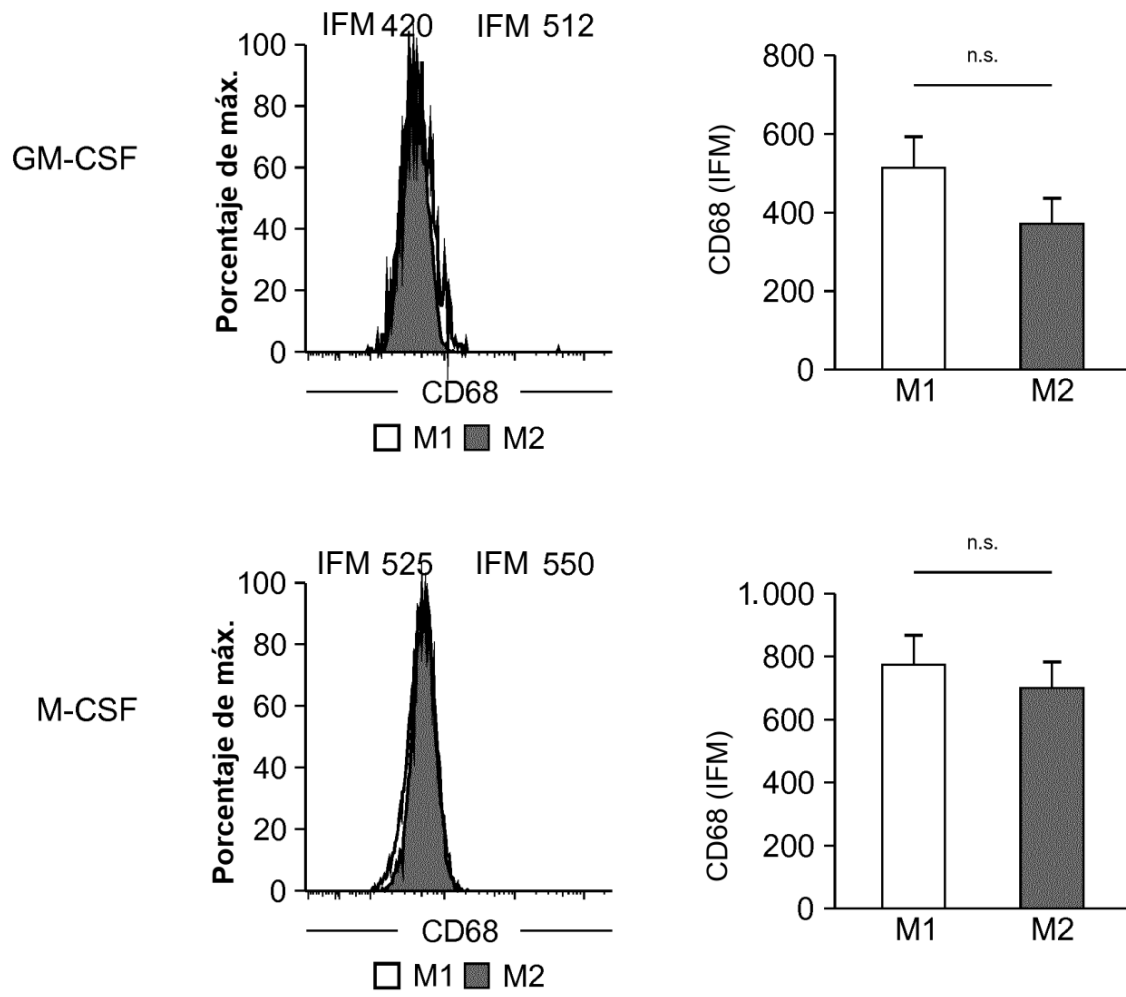


Fig.1c

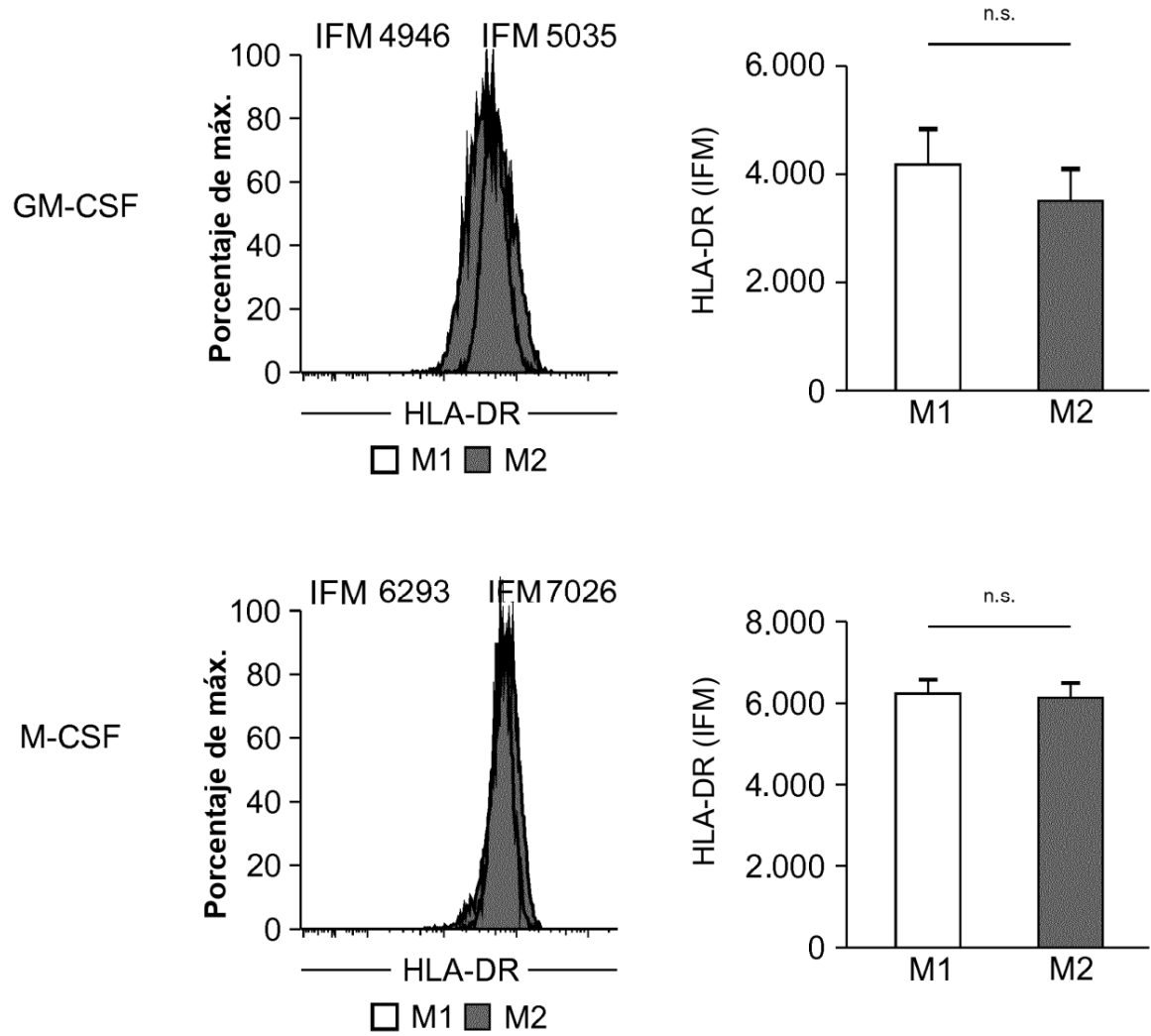


Fig.1d

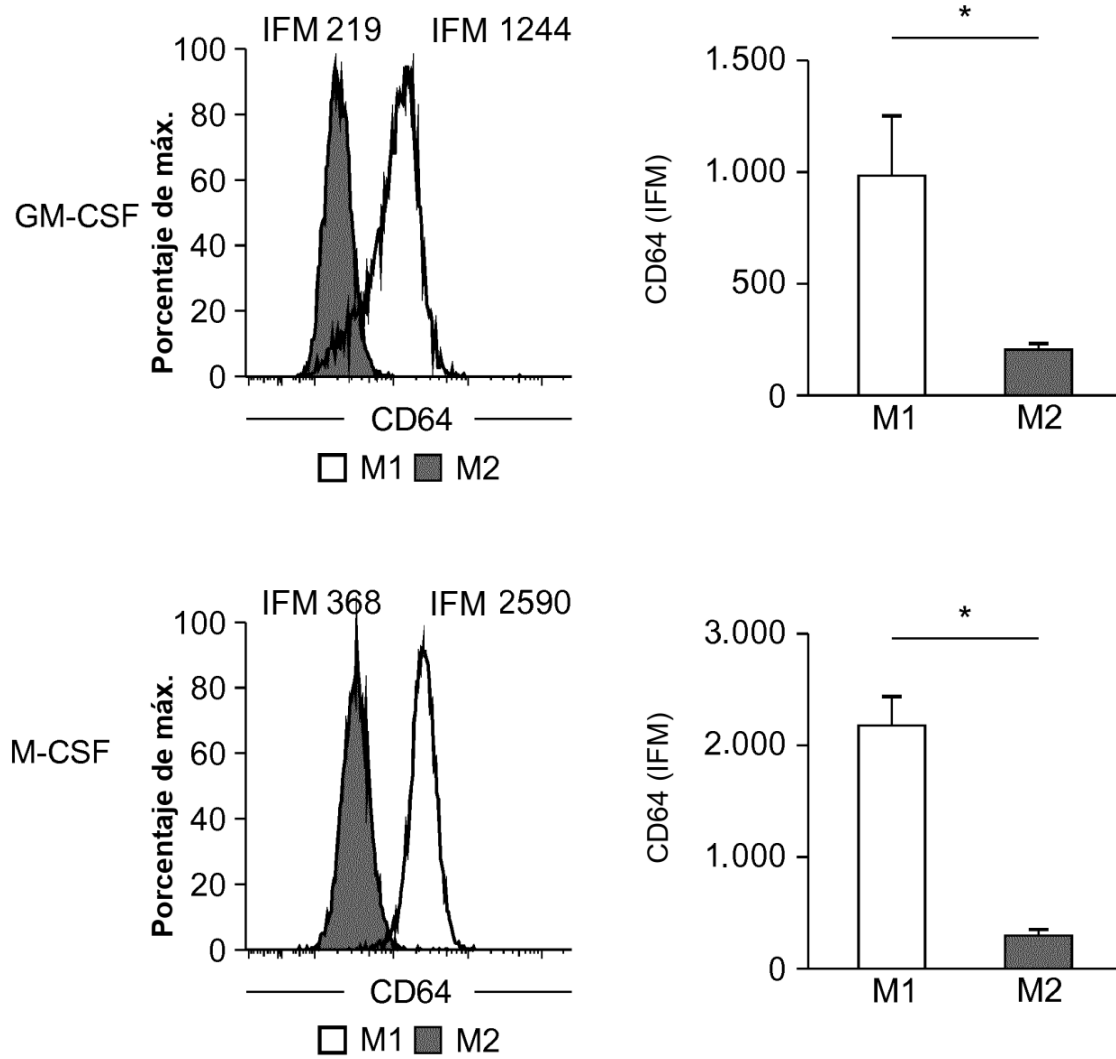


Fig.1e

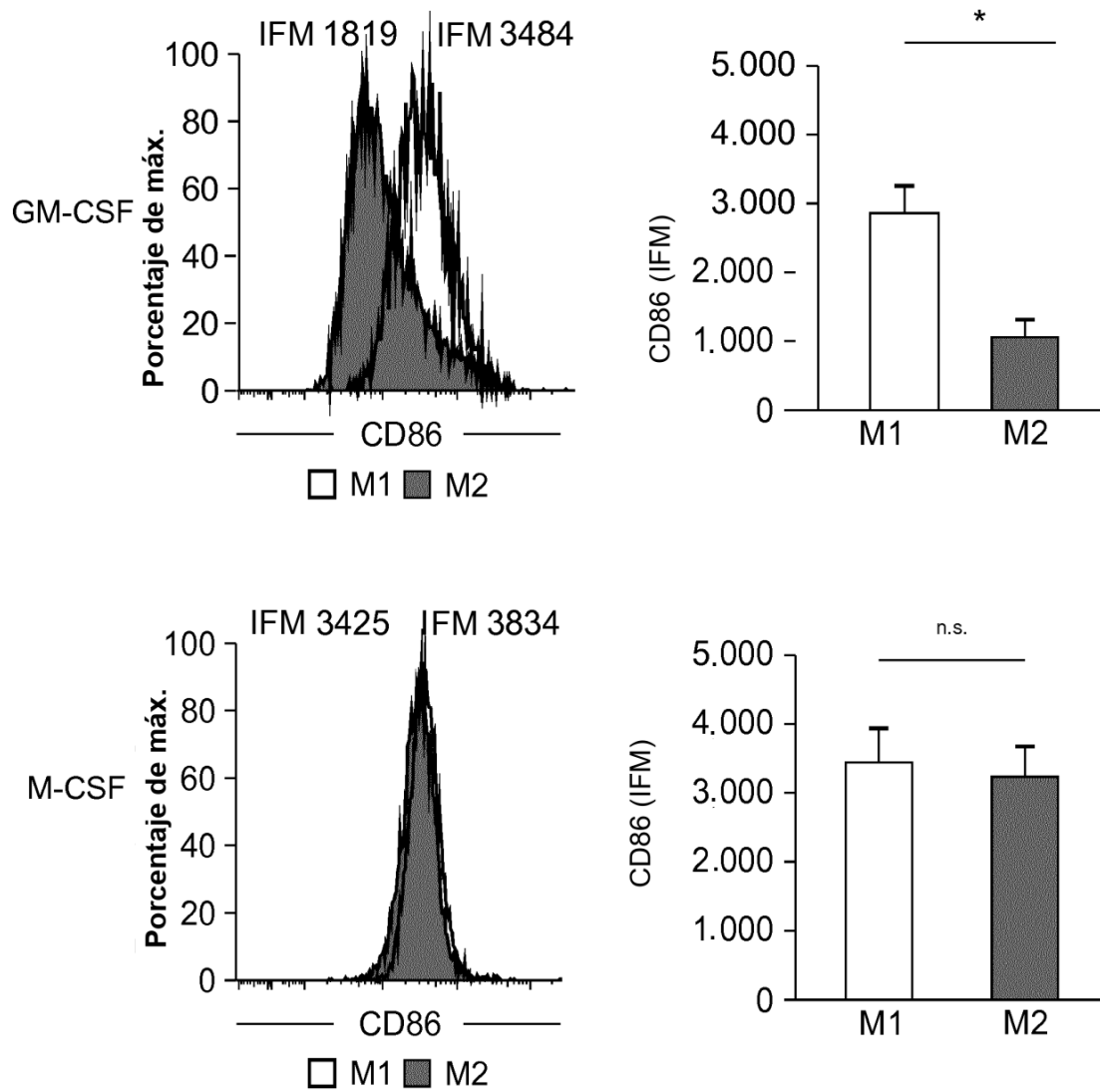


Fig.1f

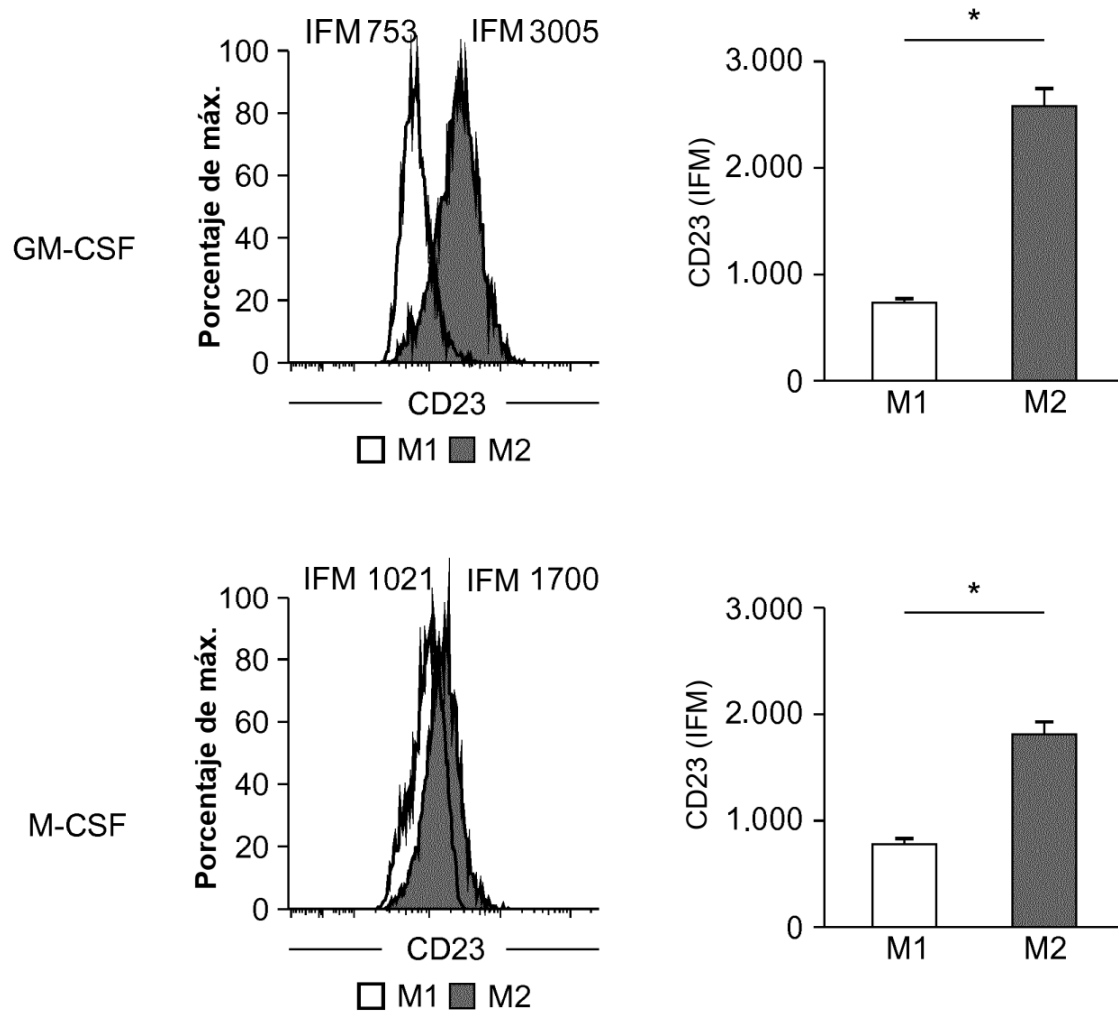


Fig.1g

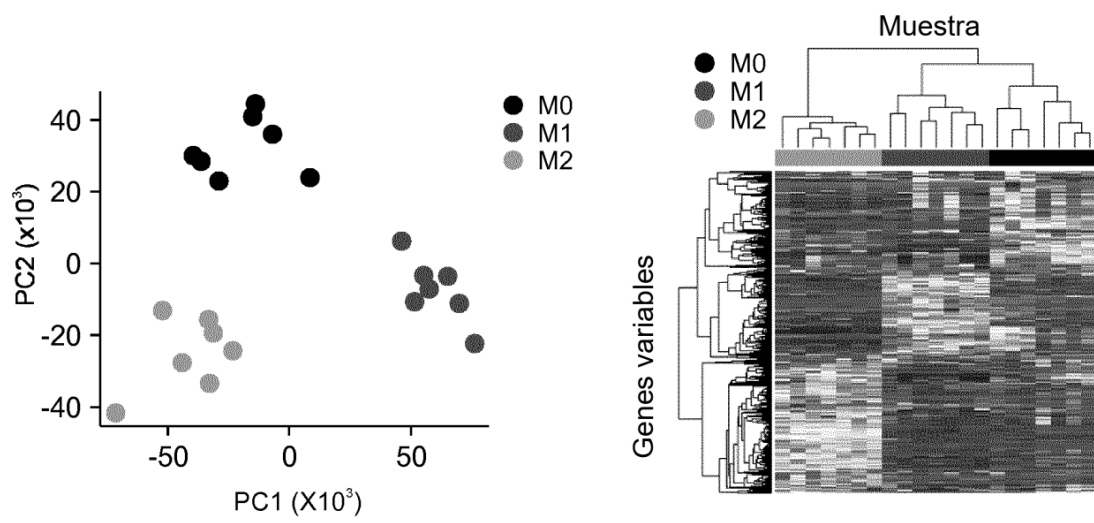


Fig.2a

Fig.2b

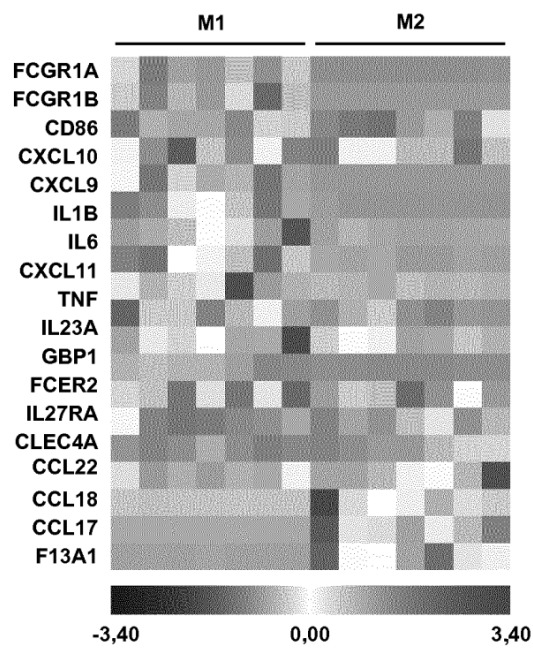


Fig.2c

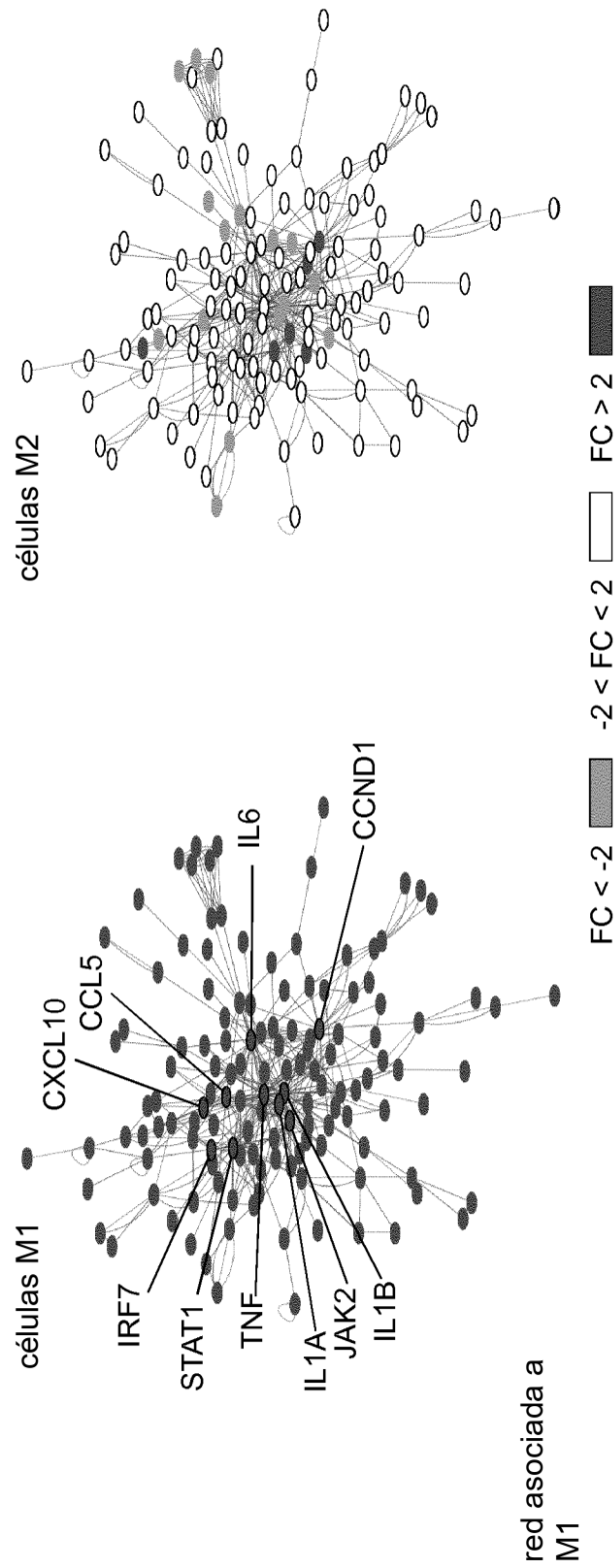


Fig.2d

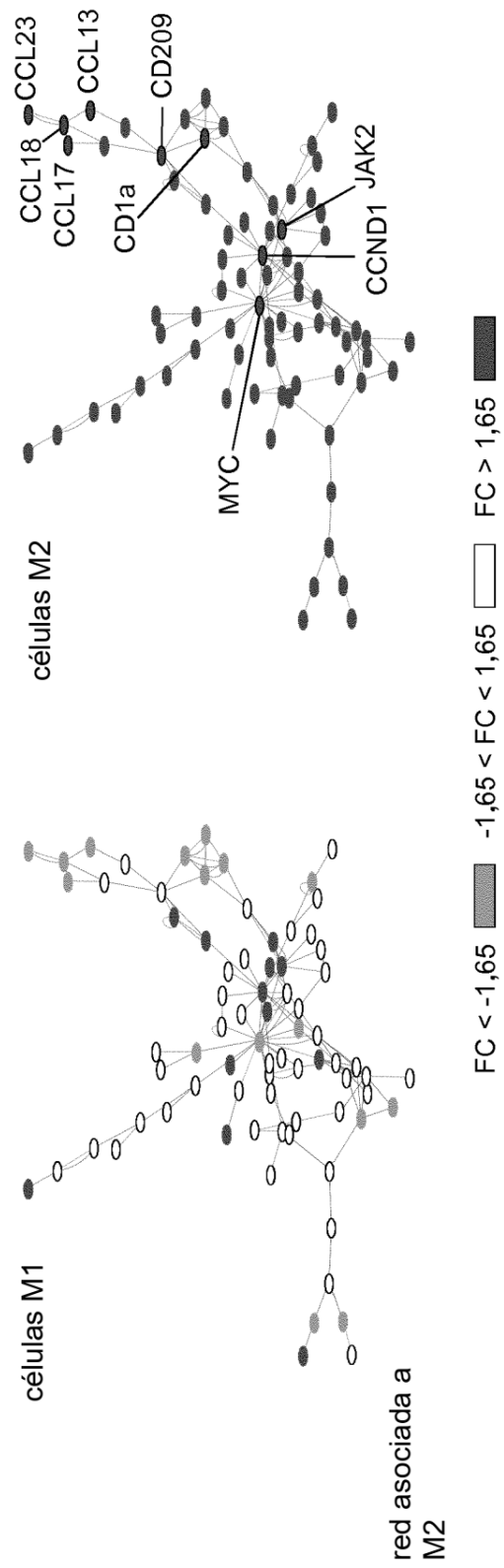


Fig.2e

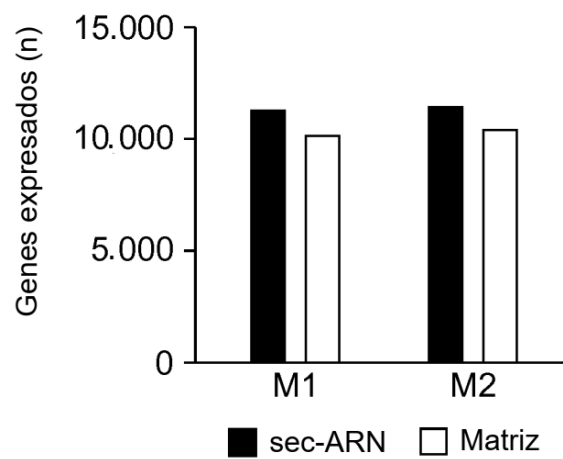


Fig.3a

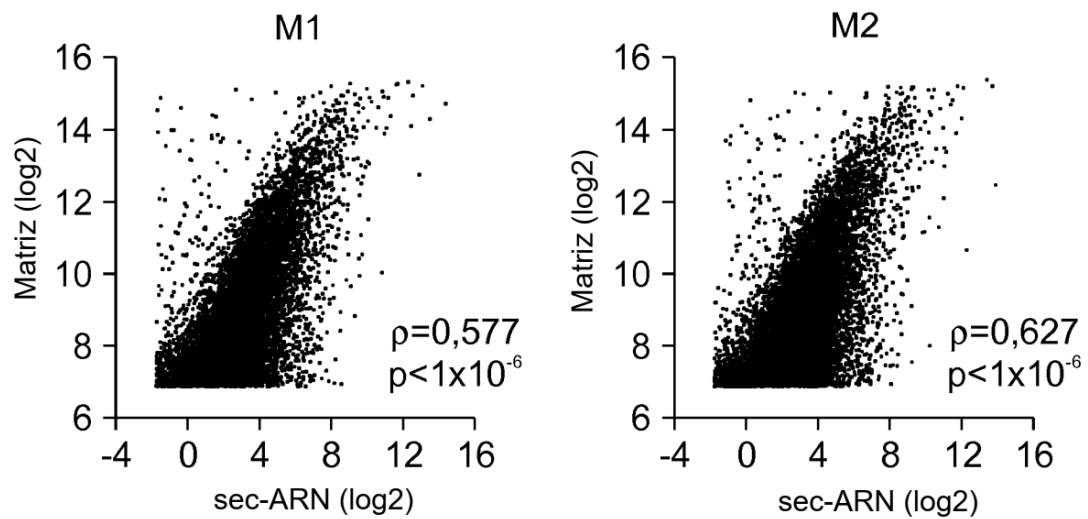


Fig.3b

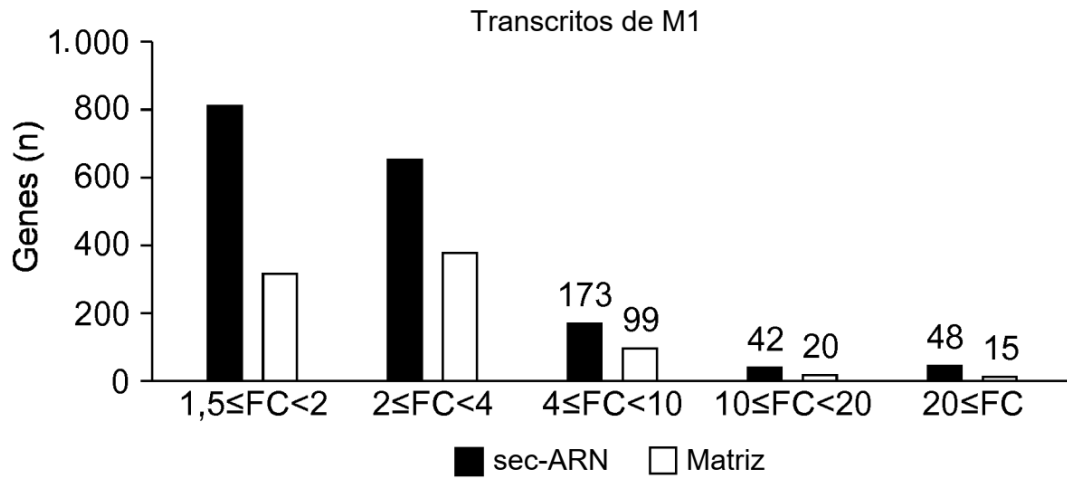


Fig.3c

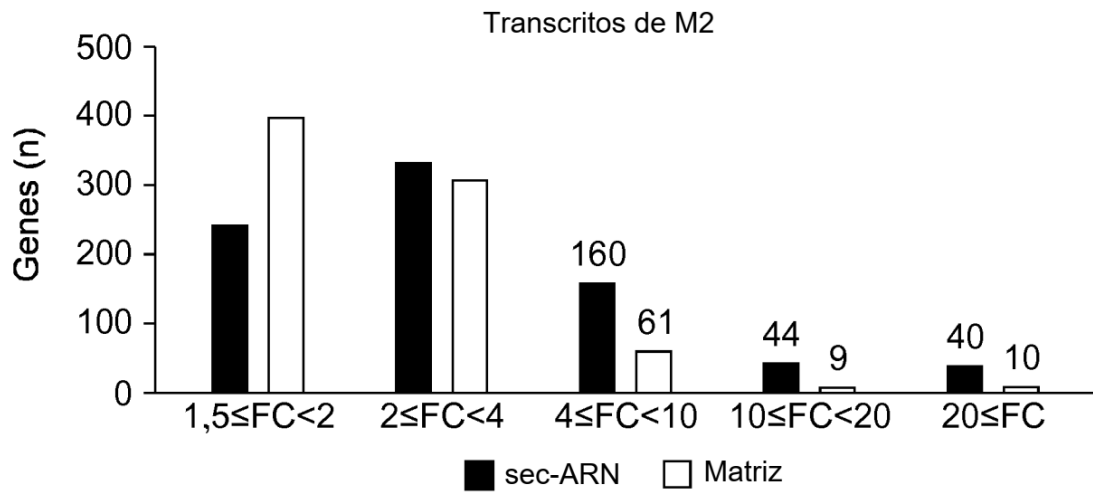


Fig.3d

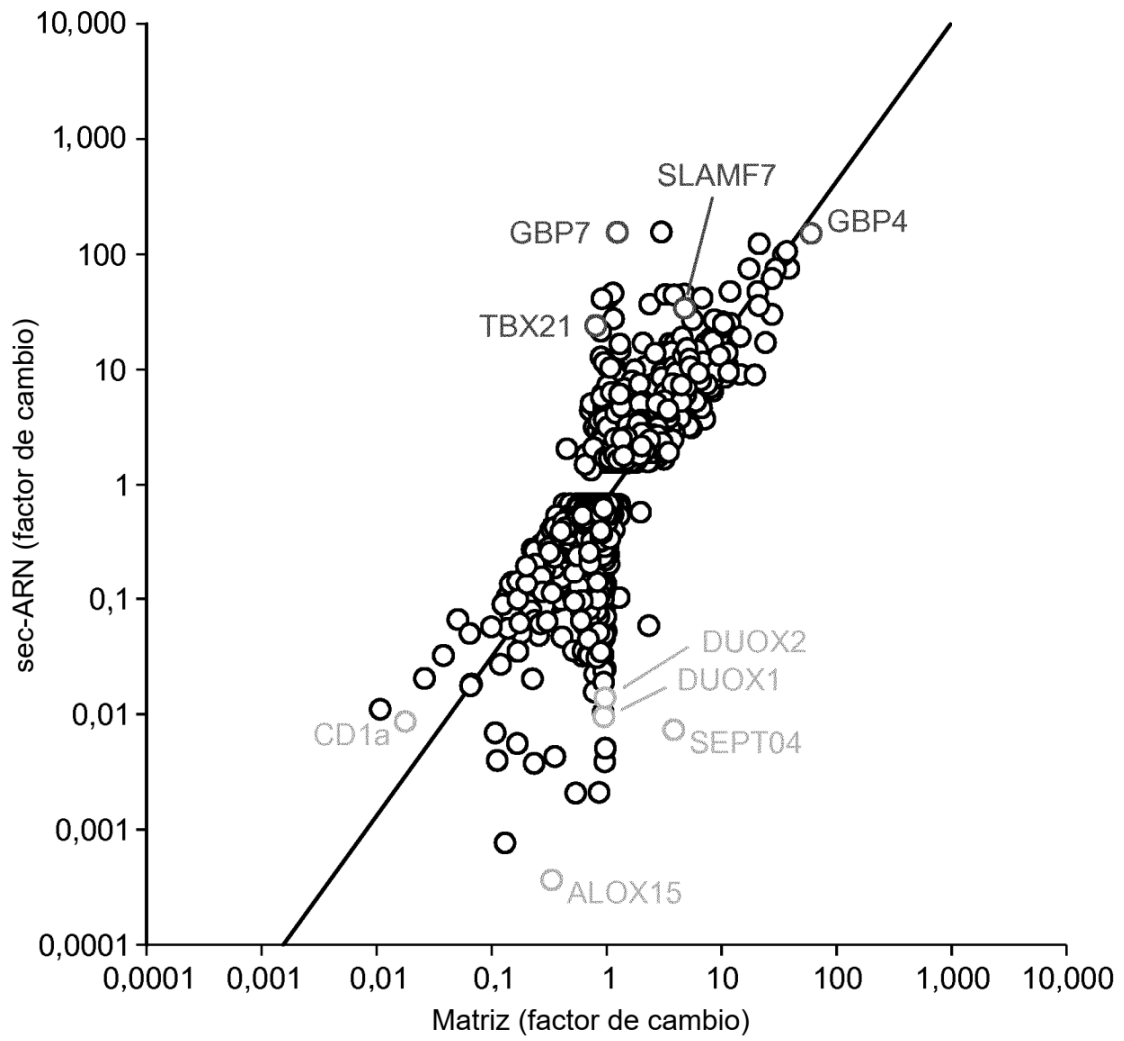


Fig.3e

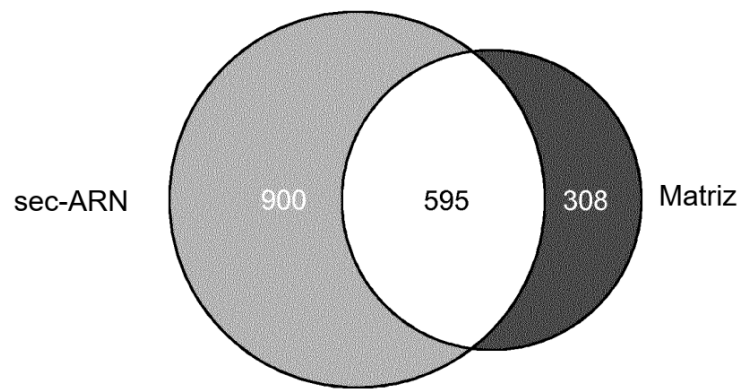


Fig.3f

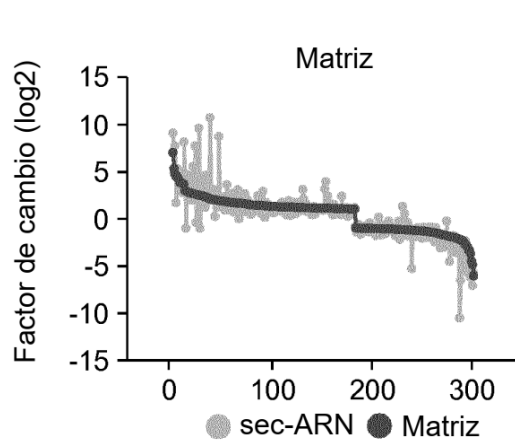


Fig.3g

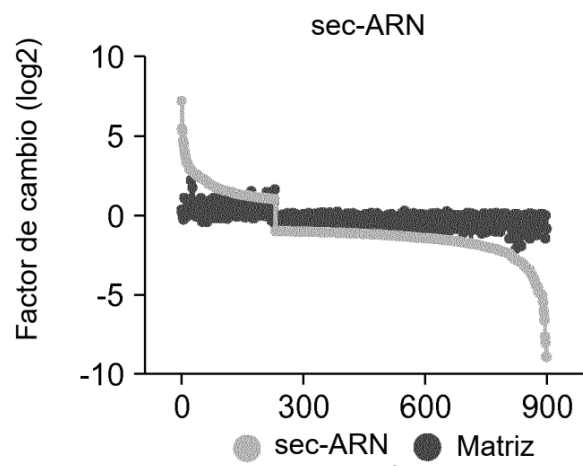


Fig.3h



Fig.3i

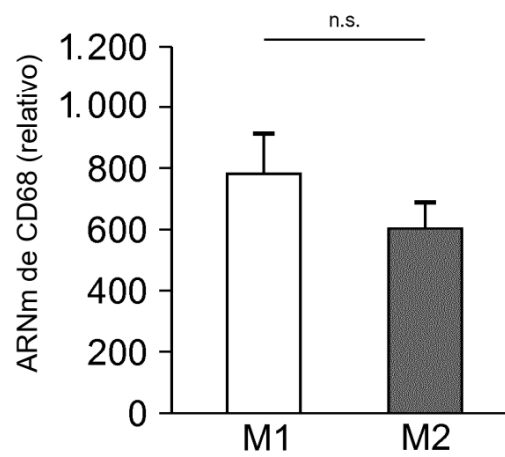
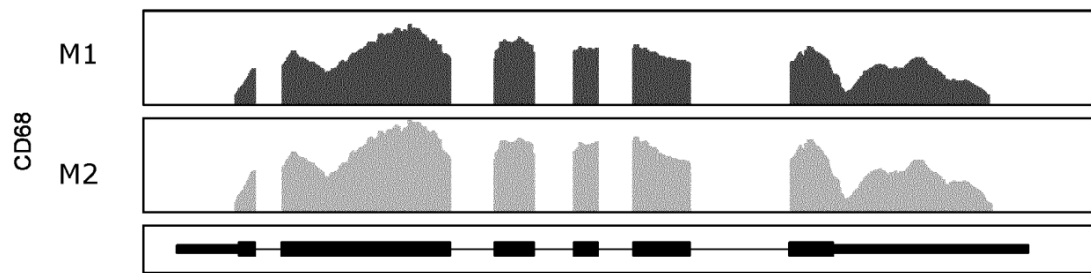


Fig.4a

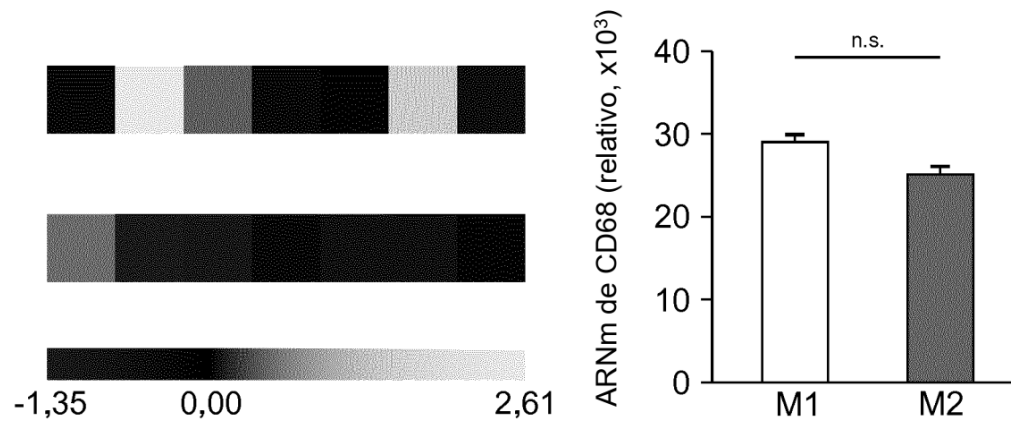


Fig.4b

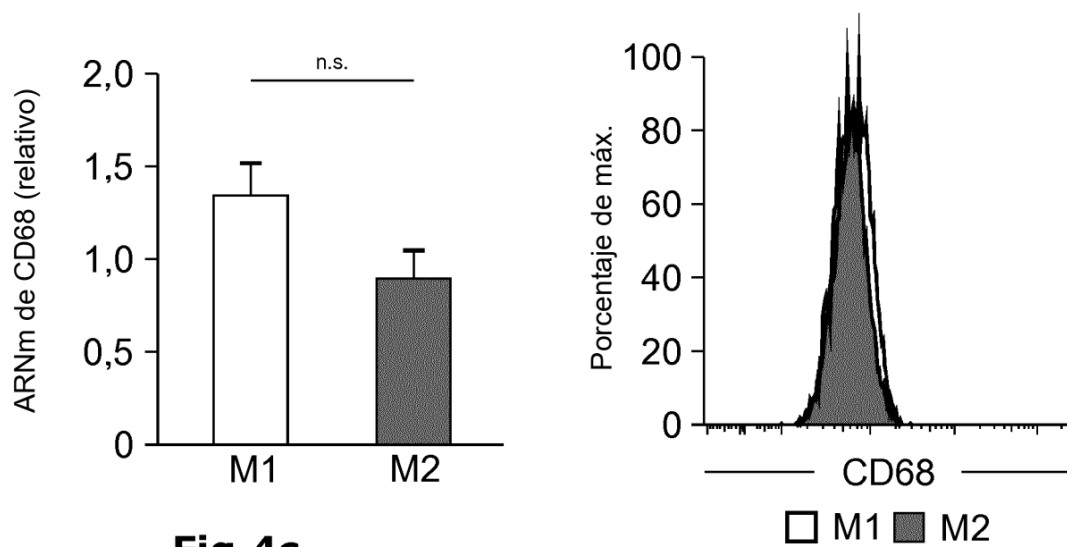


Fig.4c

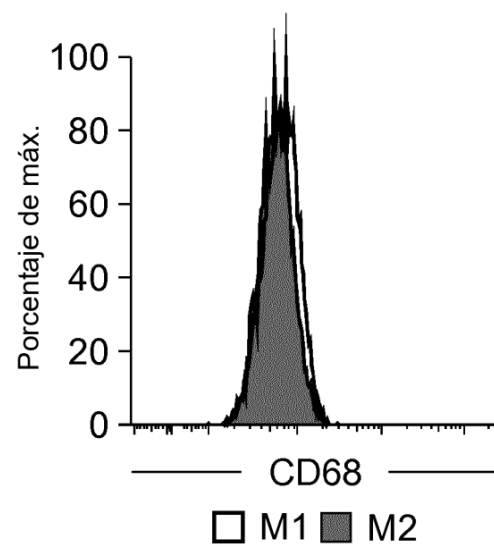


Fig.4d

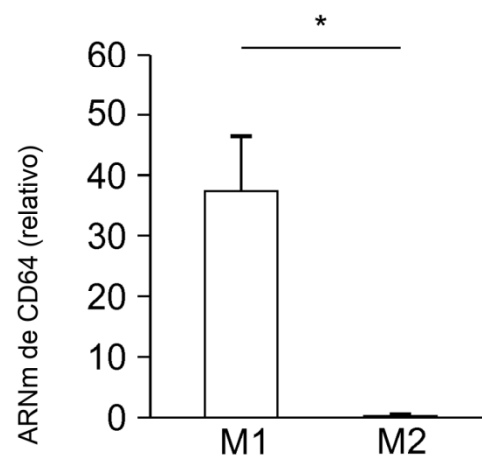
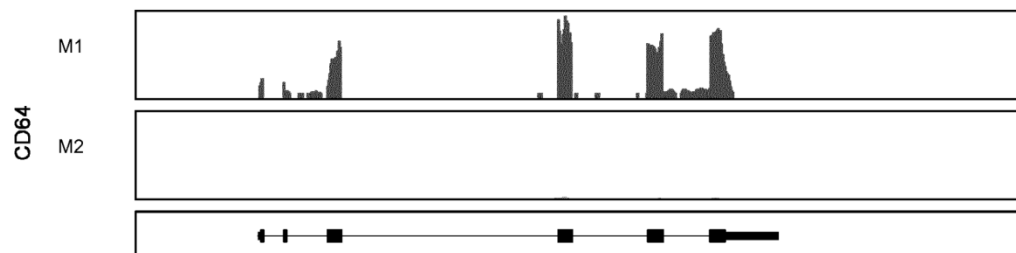


Fig.4e

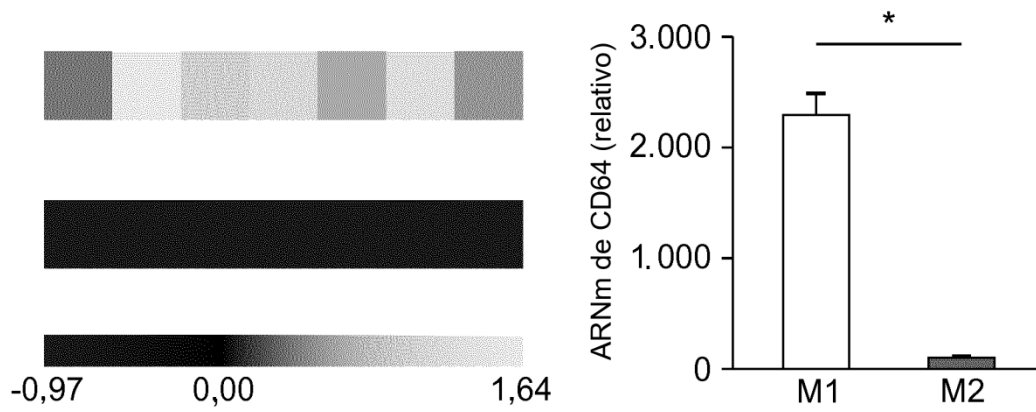


Fig.4f

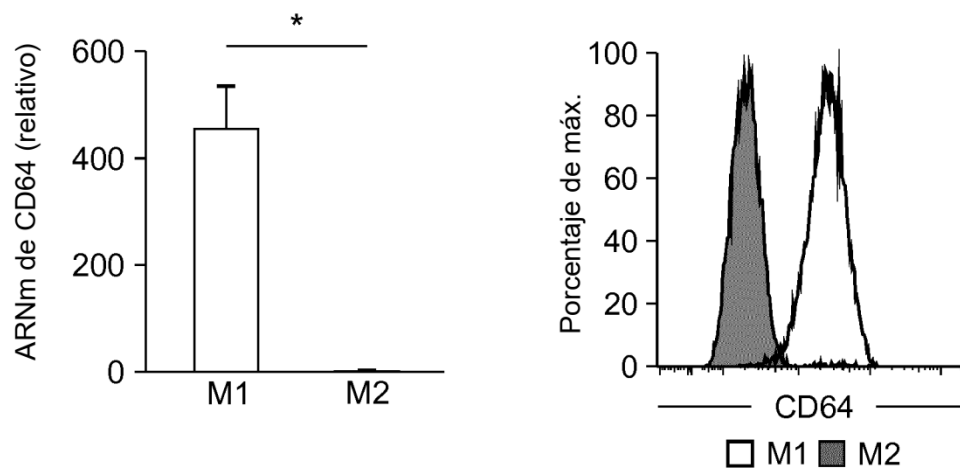


Fig.4g

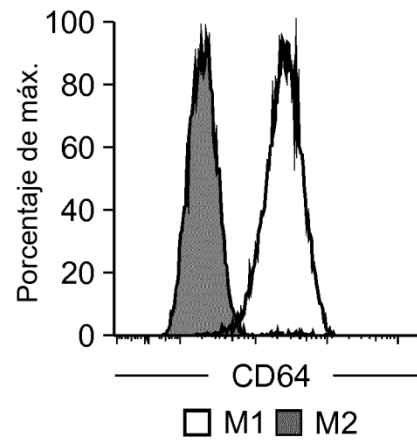


Fig.4h

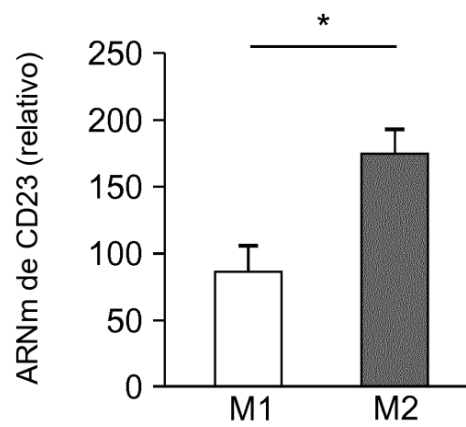
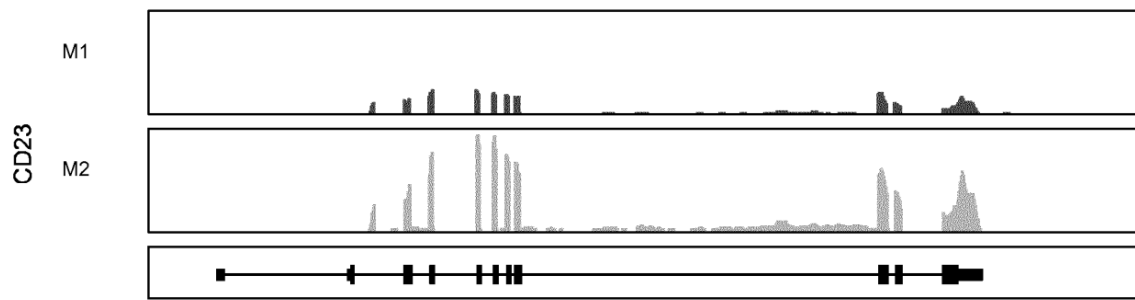


Fig.4i

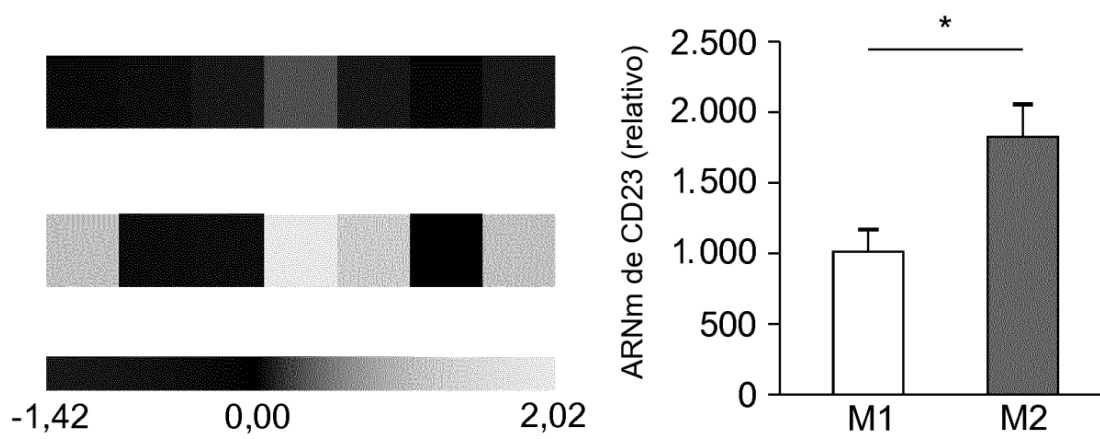


Fig.4j

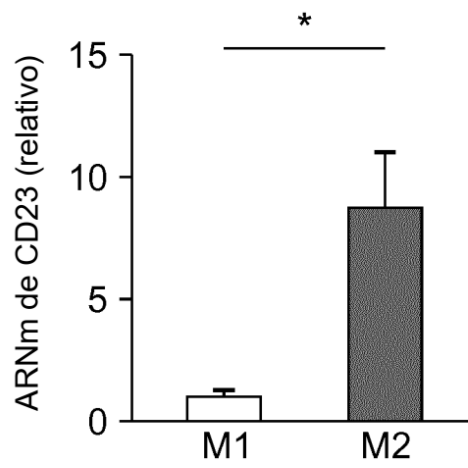


Fig.4k

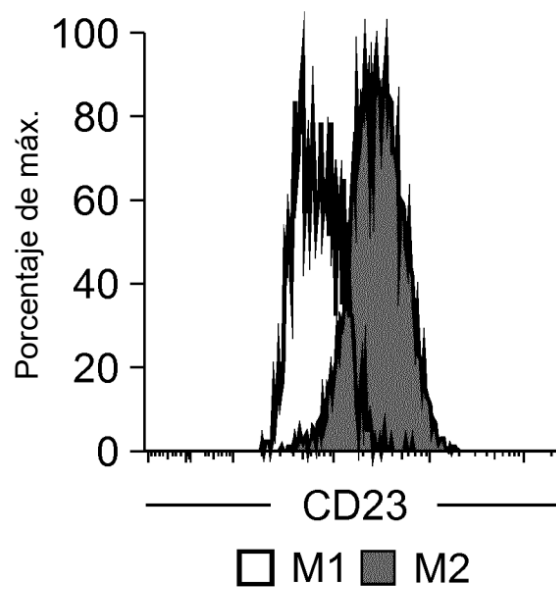


Fig.4l

Fig.5a

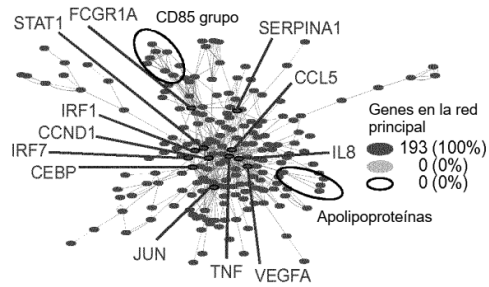
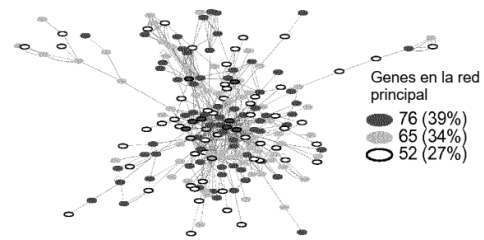


Fig.5b



FC < -2 -2 < FC < 2 2 < FC < 4 FC > 4

Fig.5c

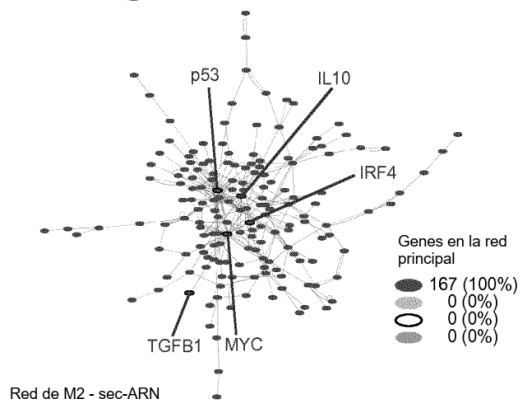
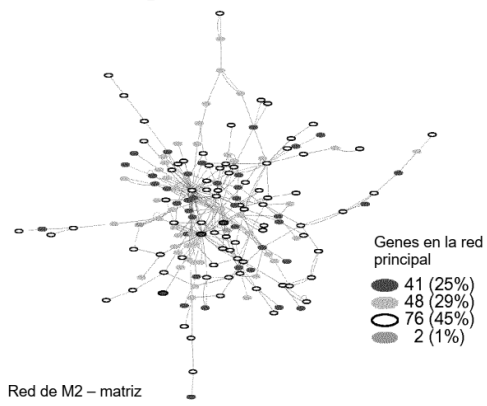


Fig.5d



FC < -1,5 -1,5 < FC < 1,5 1,5 < FC < 2,5 FC > 2,5

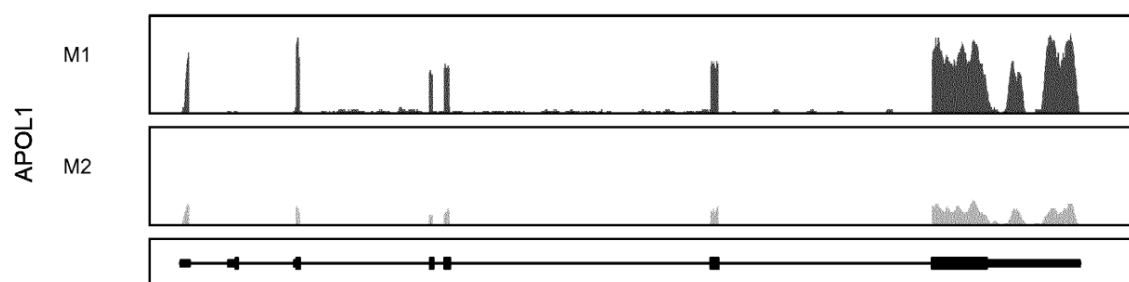


Fig.5e

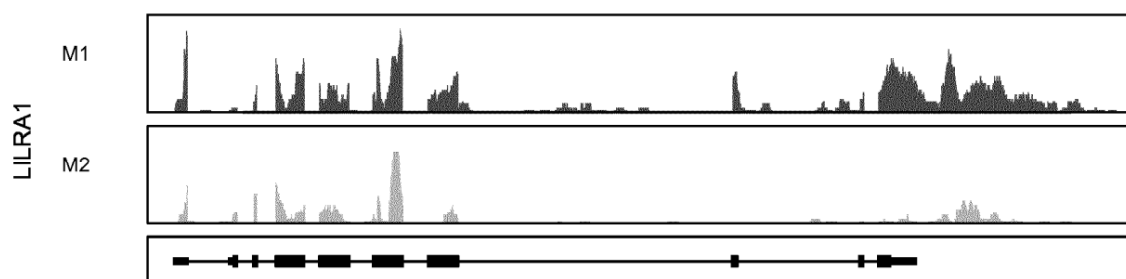
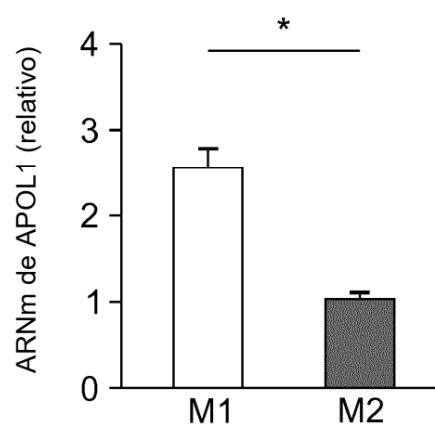


Fig.5f

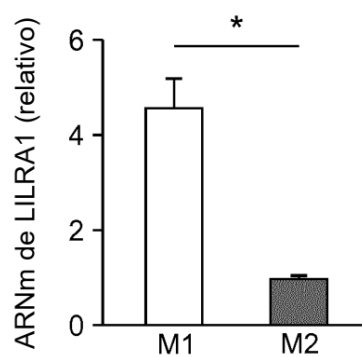


Fig.6a

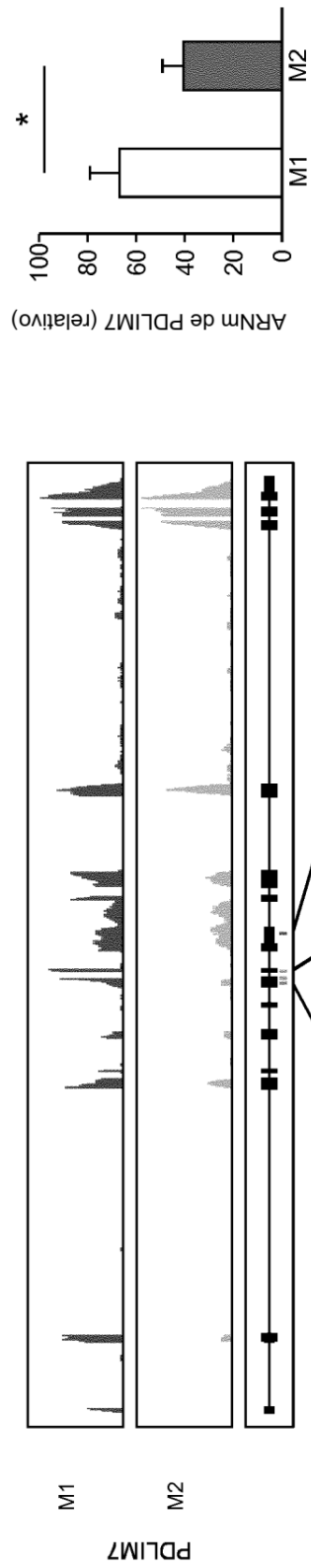
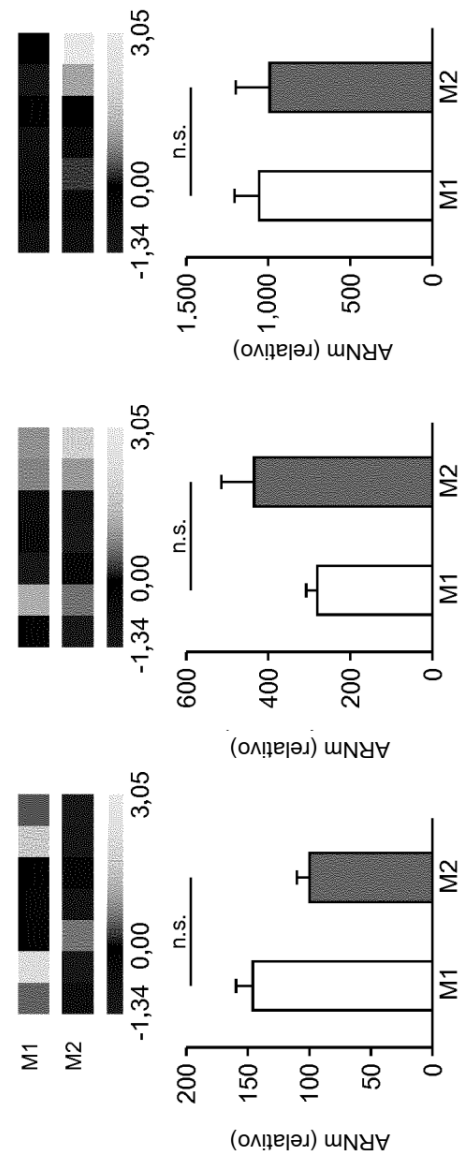


Fig.6b



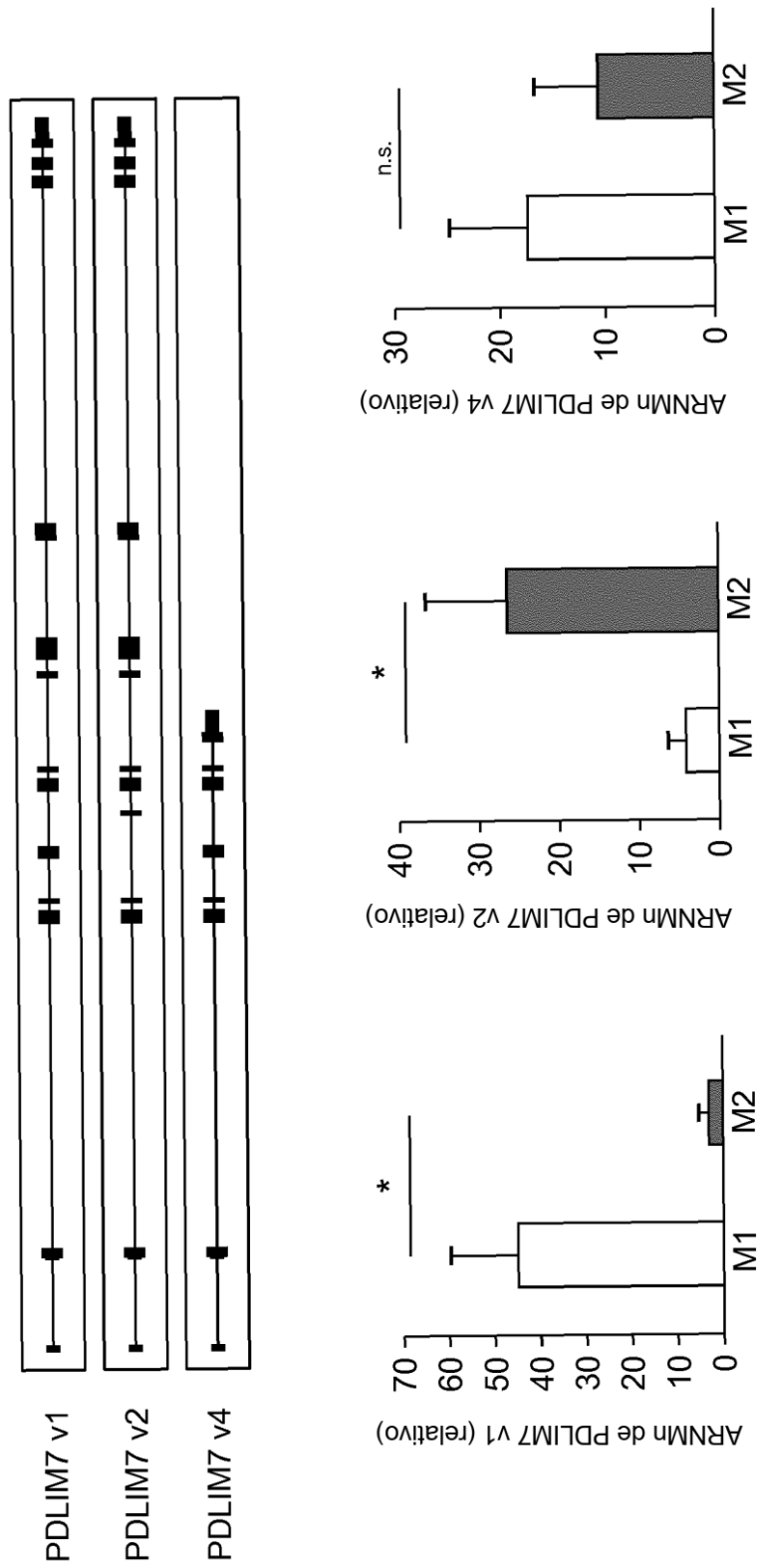


Fig.6c

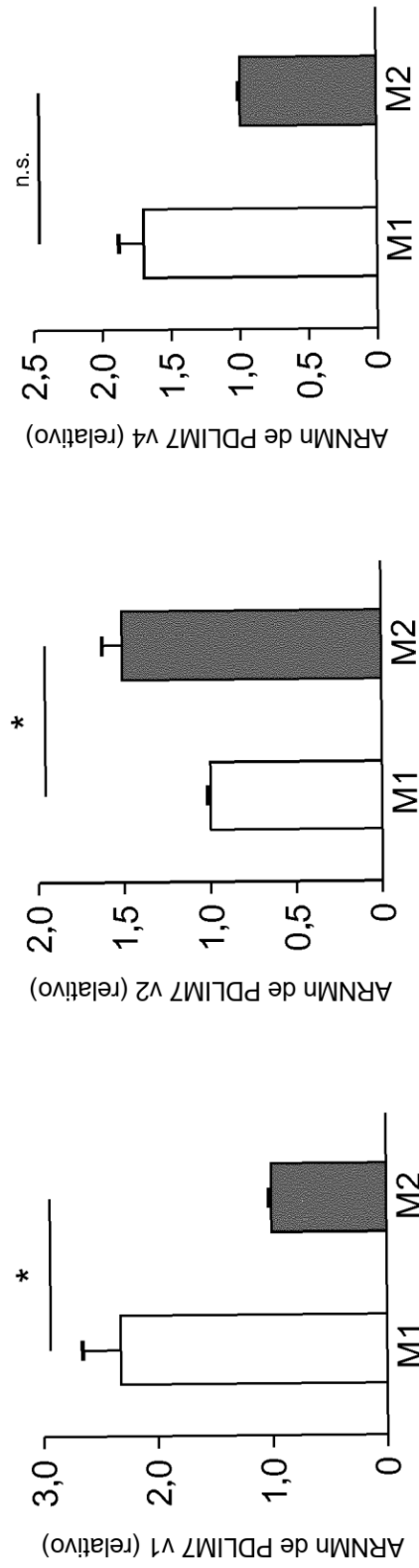


Fig.6d

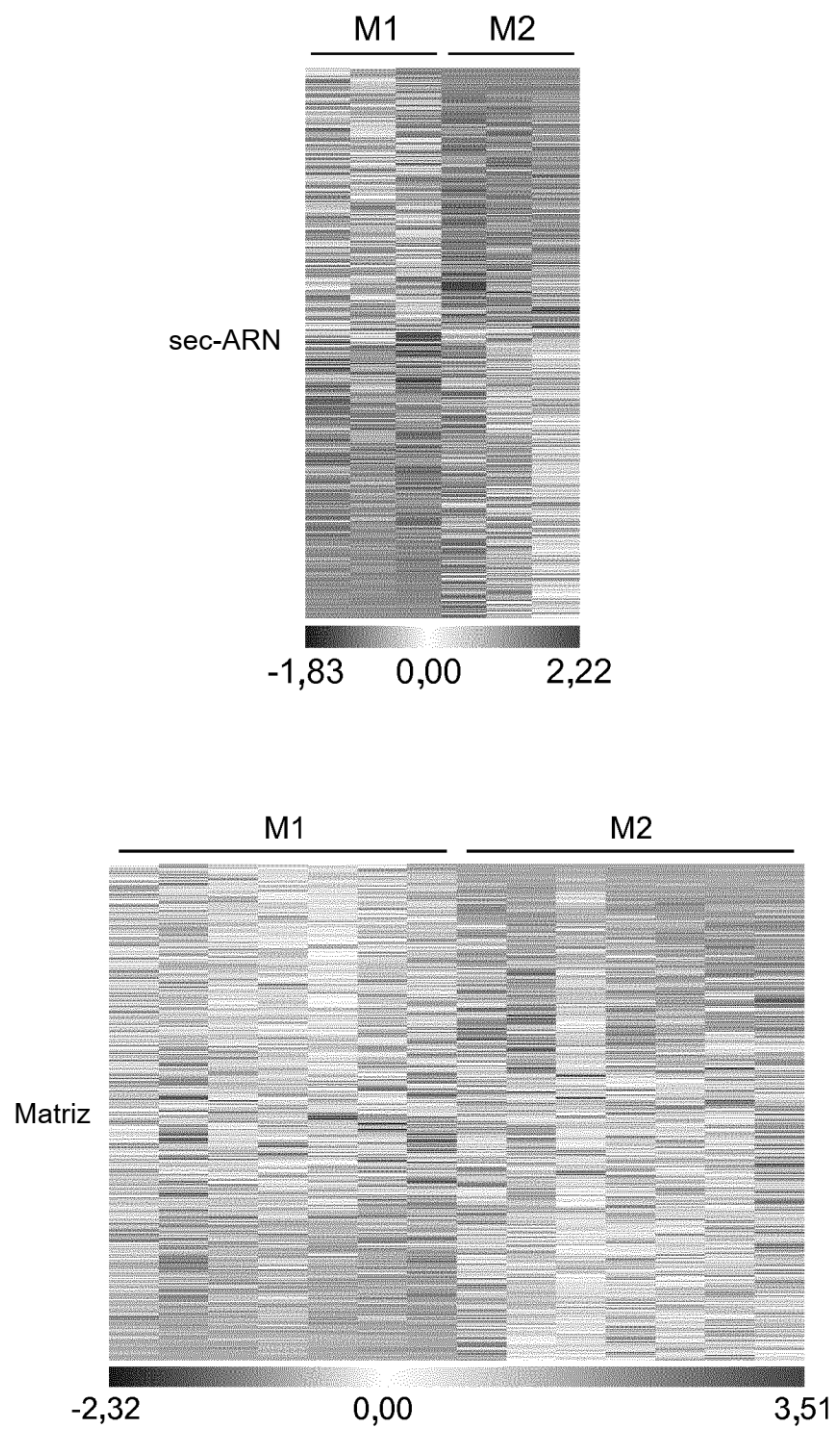


Fig.7a

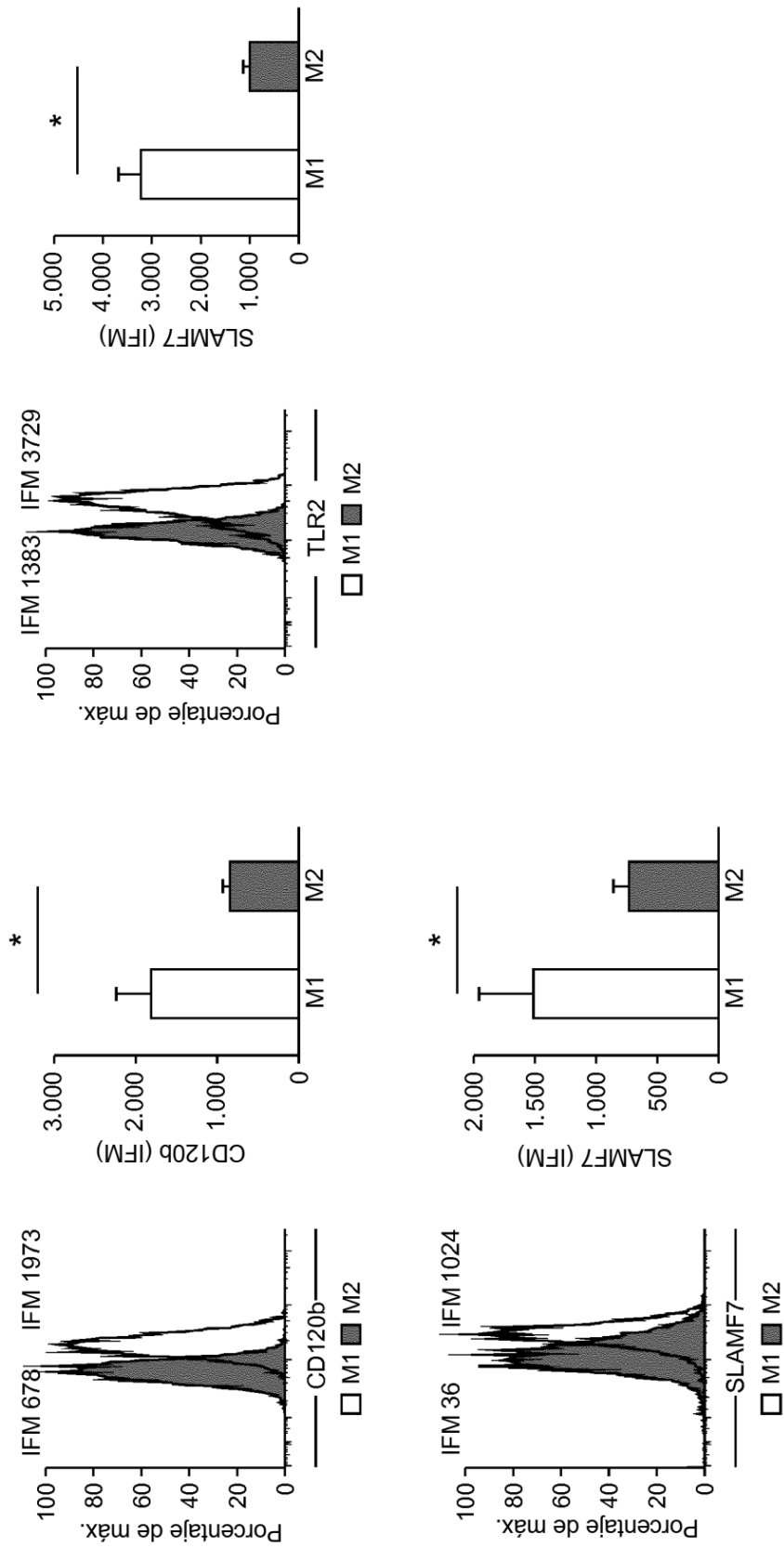


Fig.7b

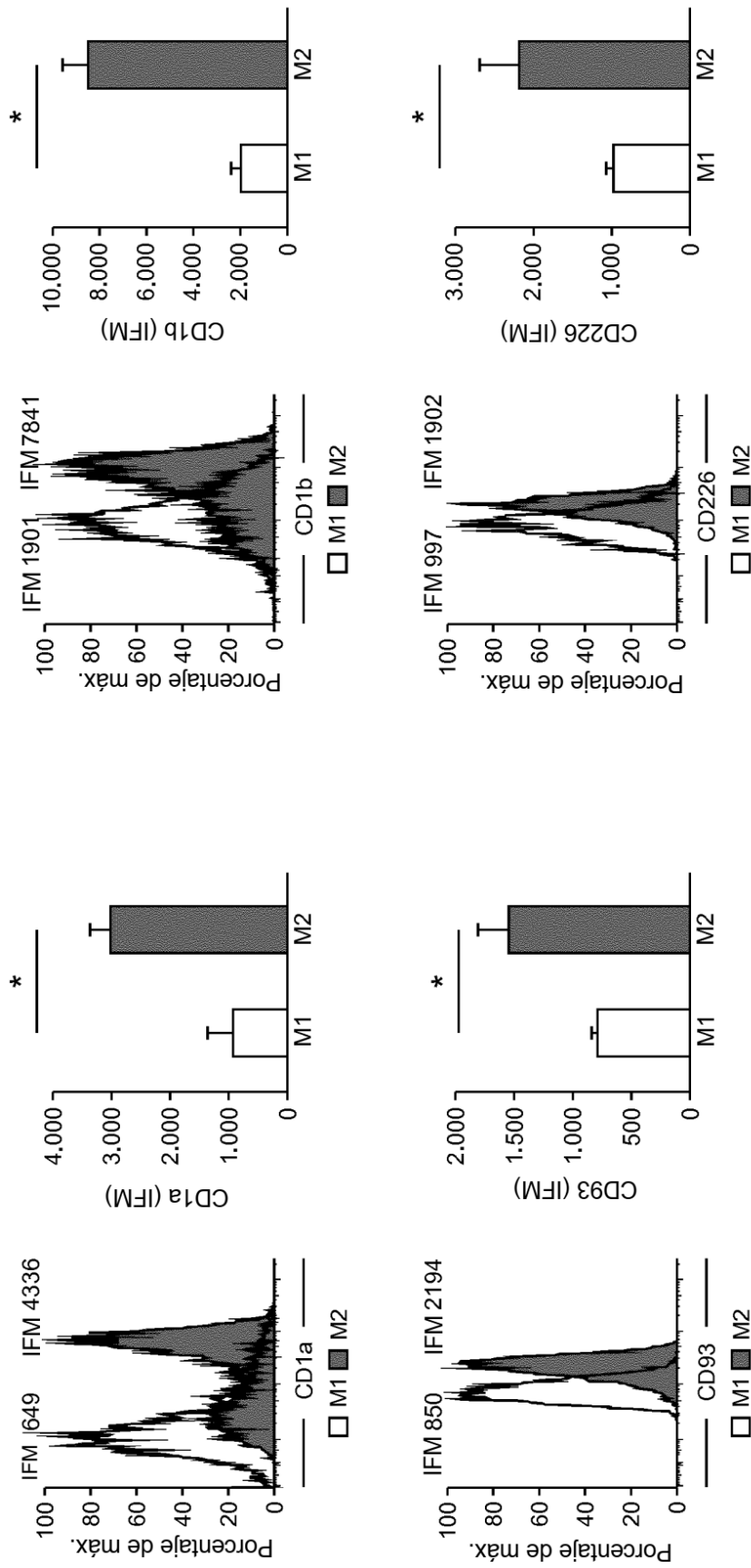


Fig.7c

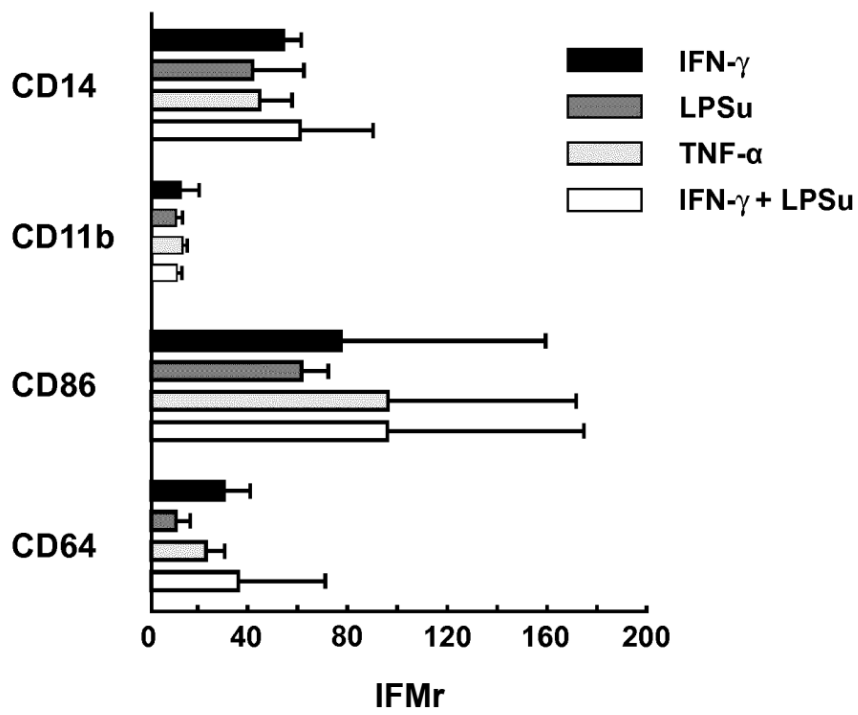


Fig.8

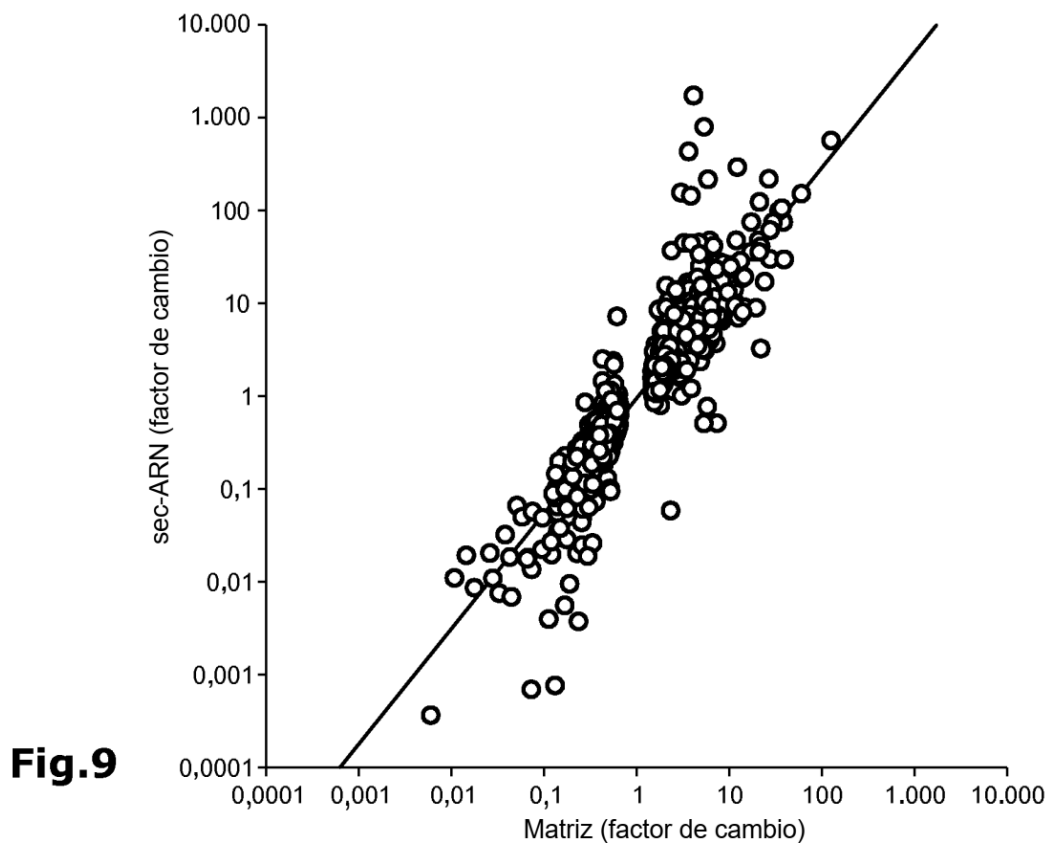


Fig.9

Fig.10a

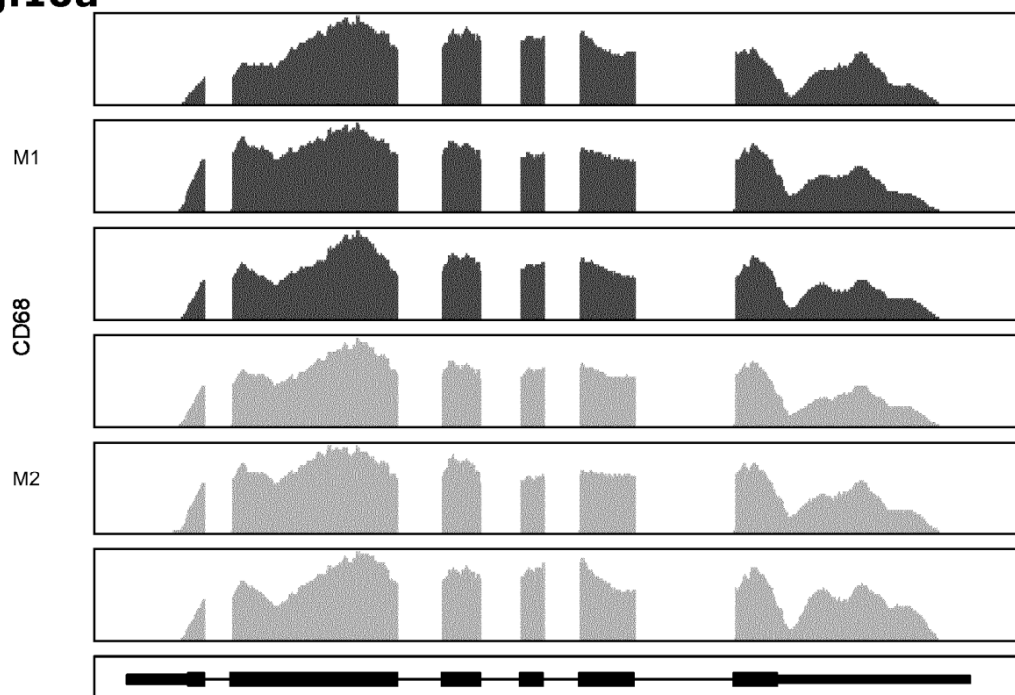


Fig.10b

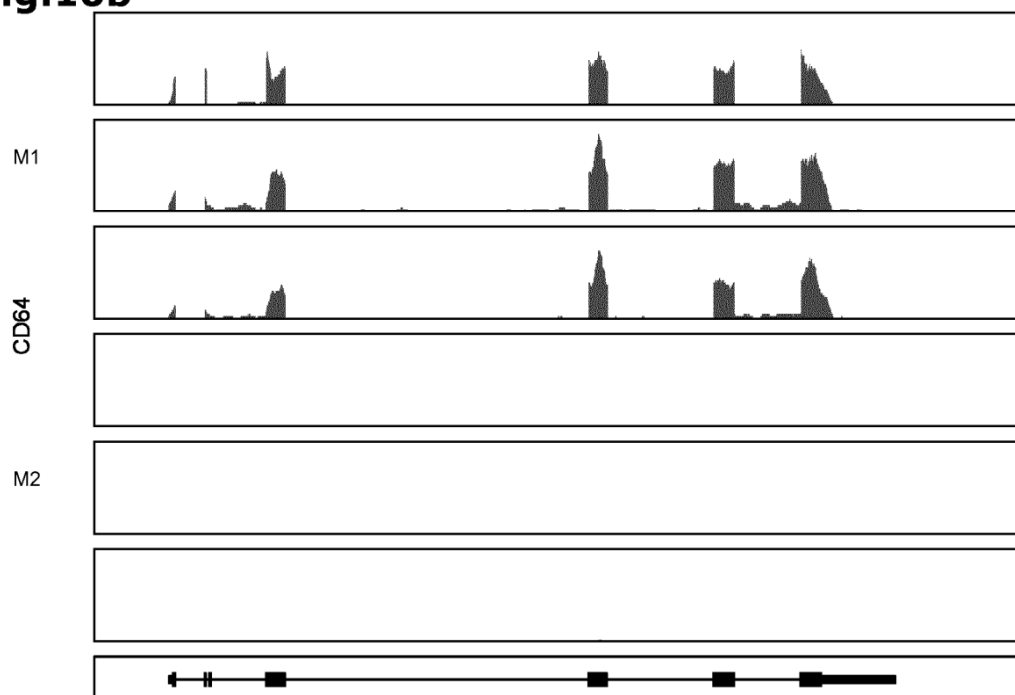


Fig.10c

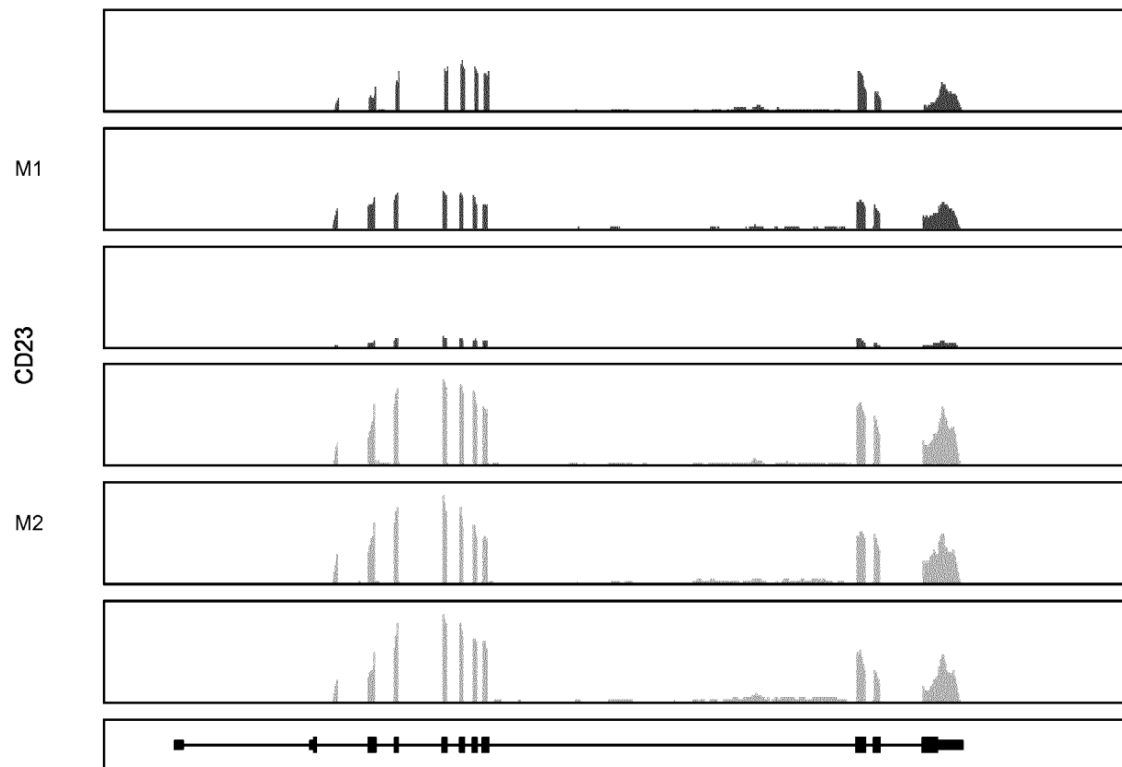


Fig.11a

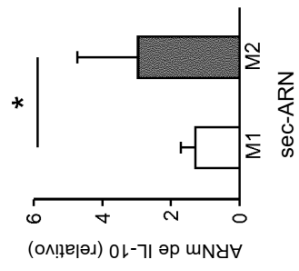
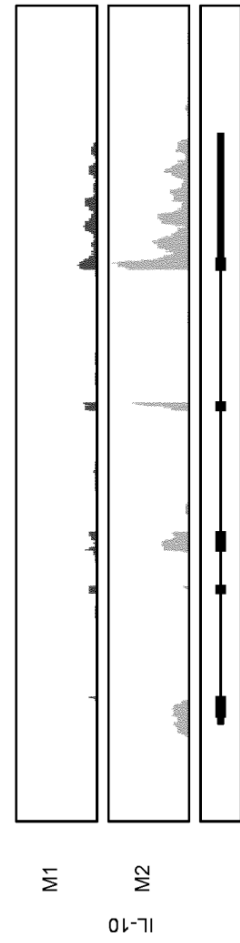
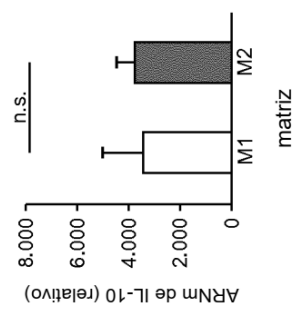


Fig.11b

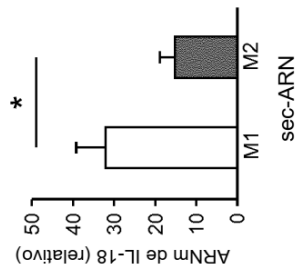
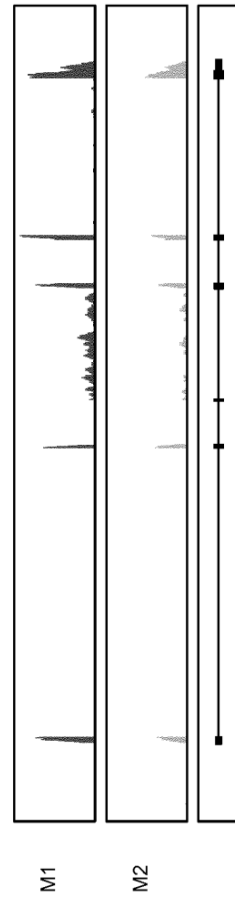
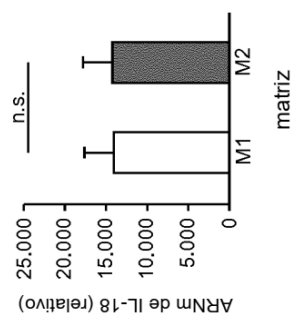


Fig.12a

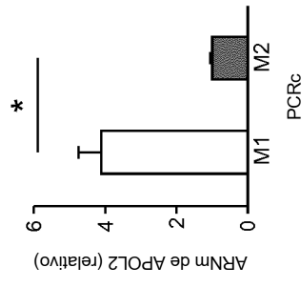
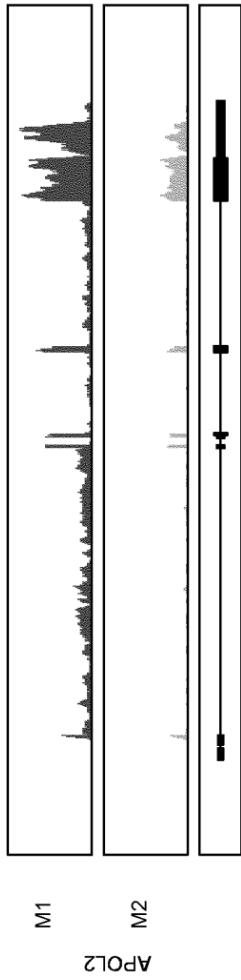
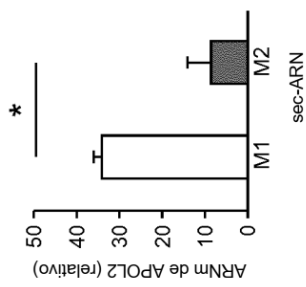


Fig.12b

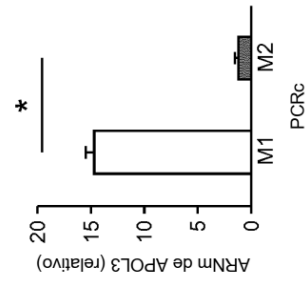
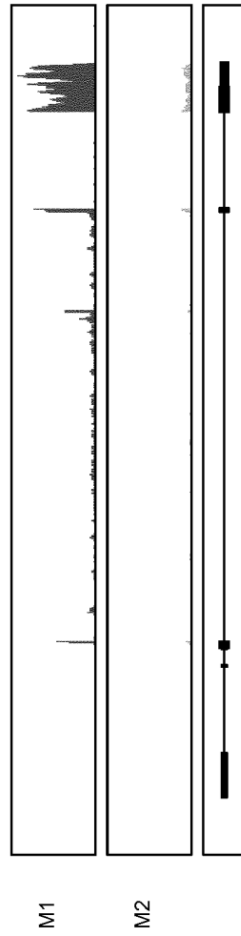
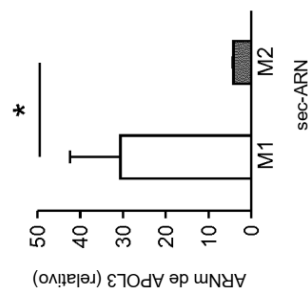


Fig.12c

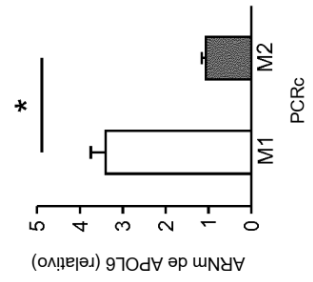
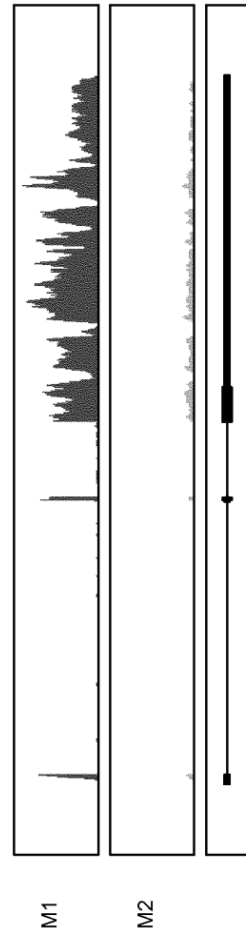
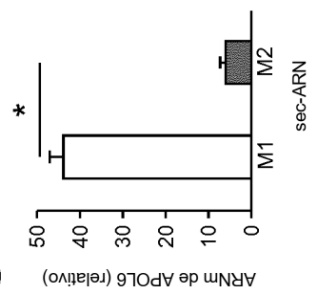


Fig.13a

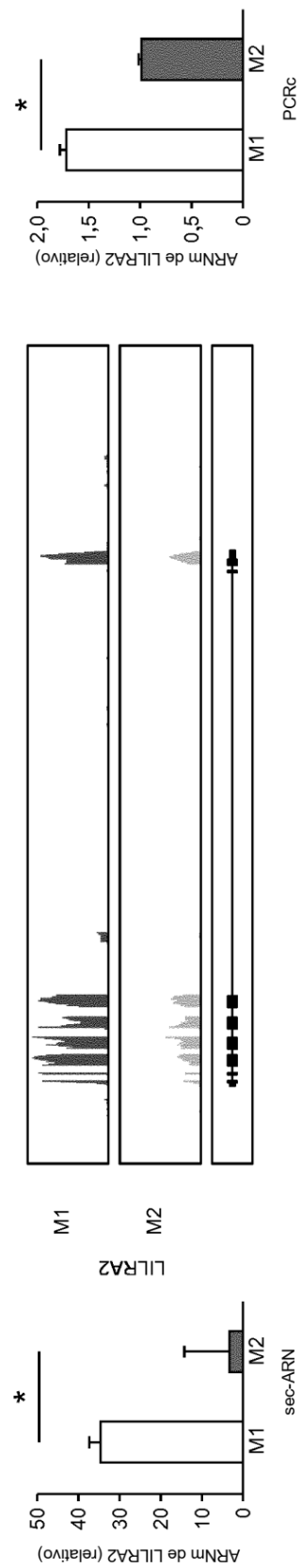


Fig.13b

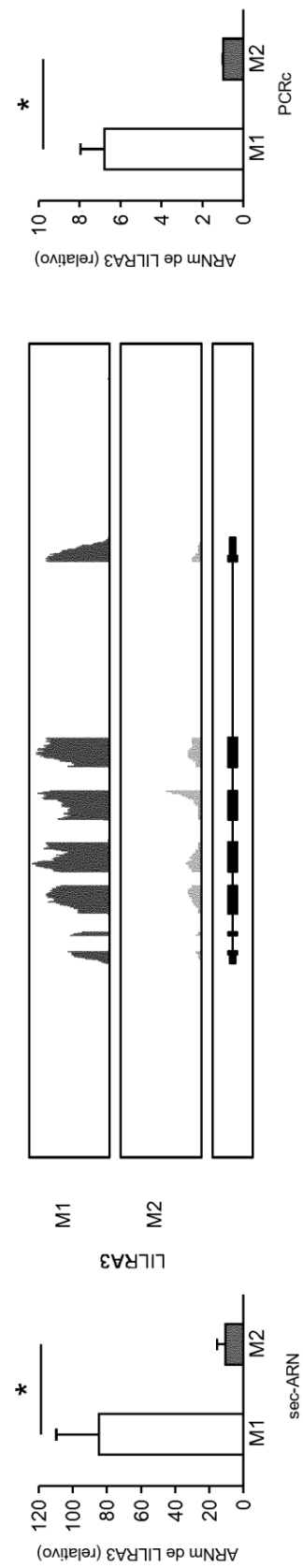


Fig.13c

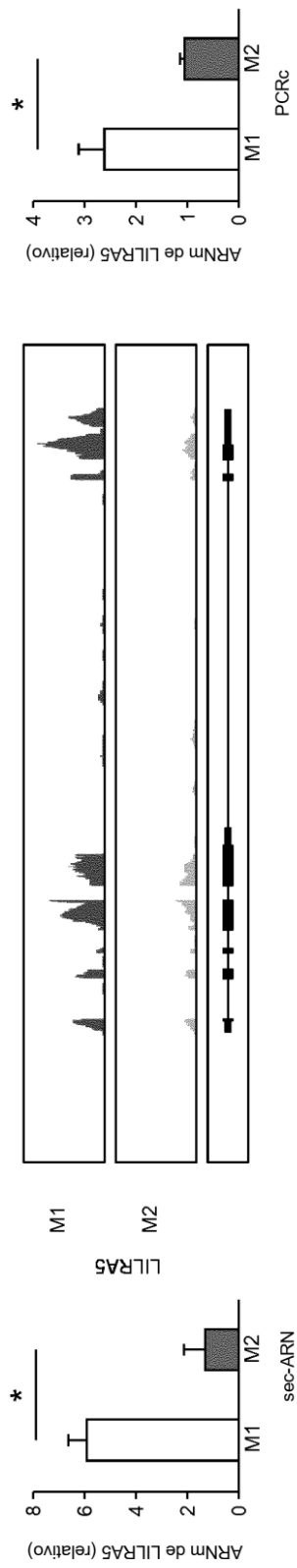


Fig.13d

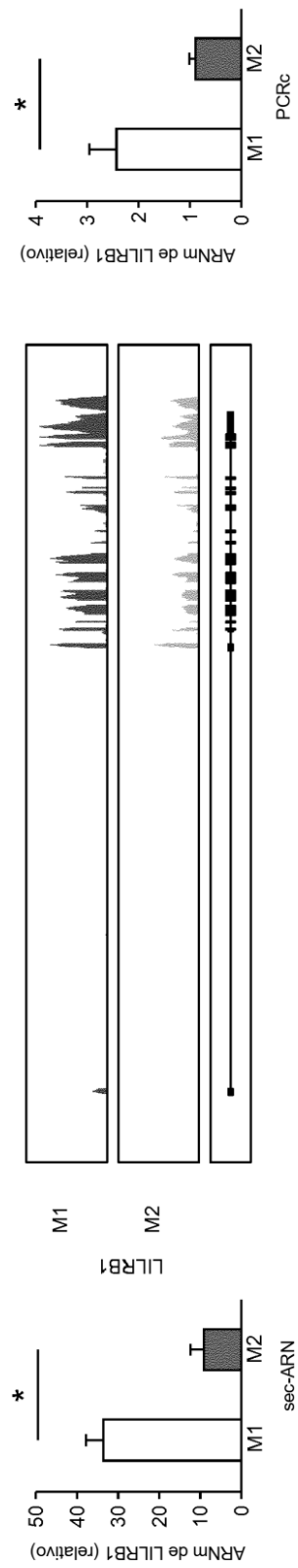
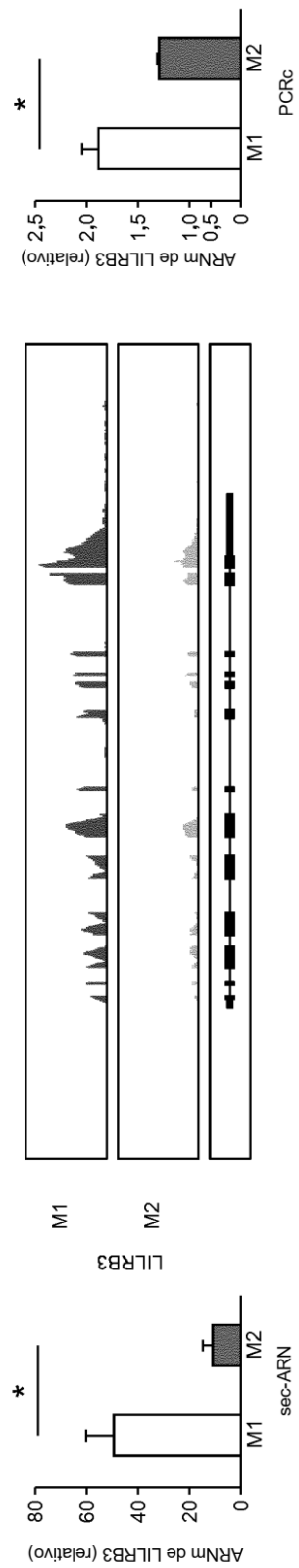


Fig.13e



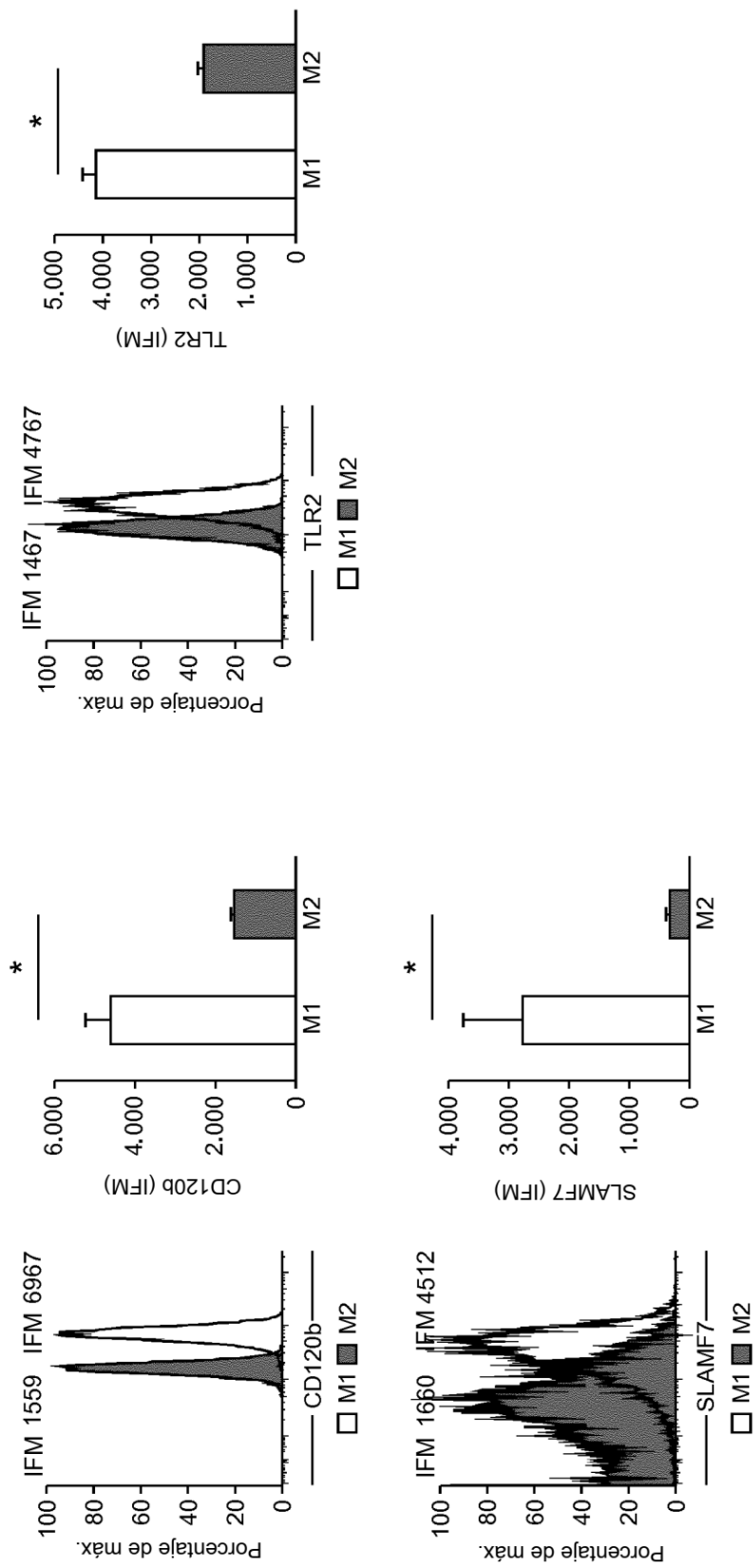


Fig.14a

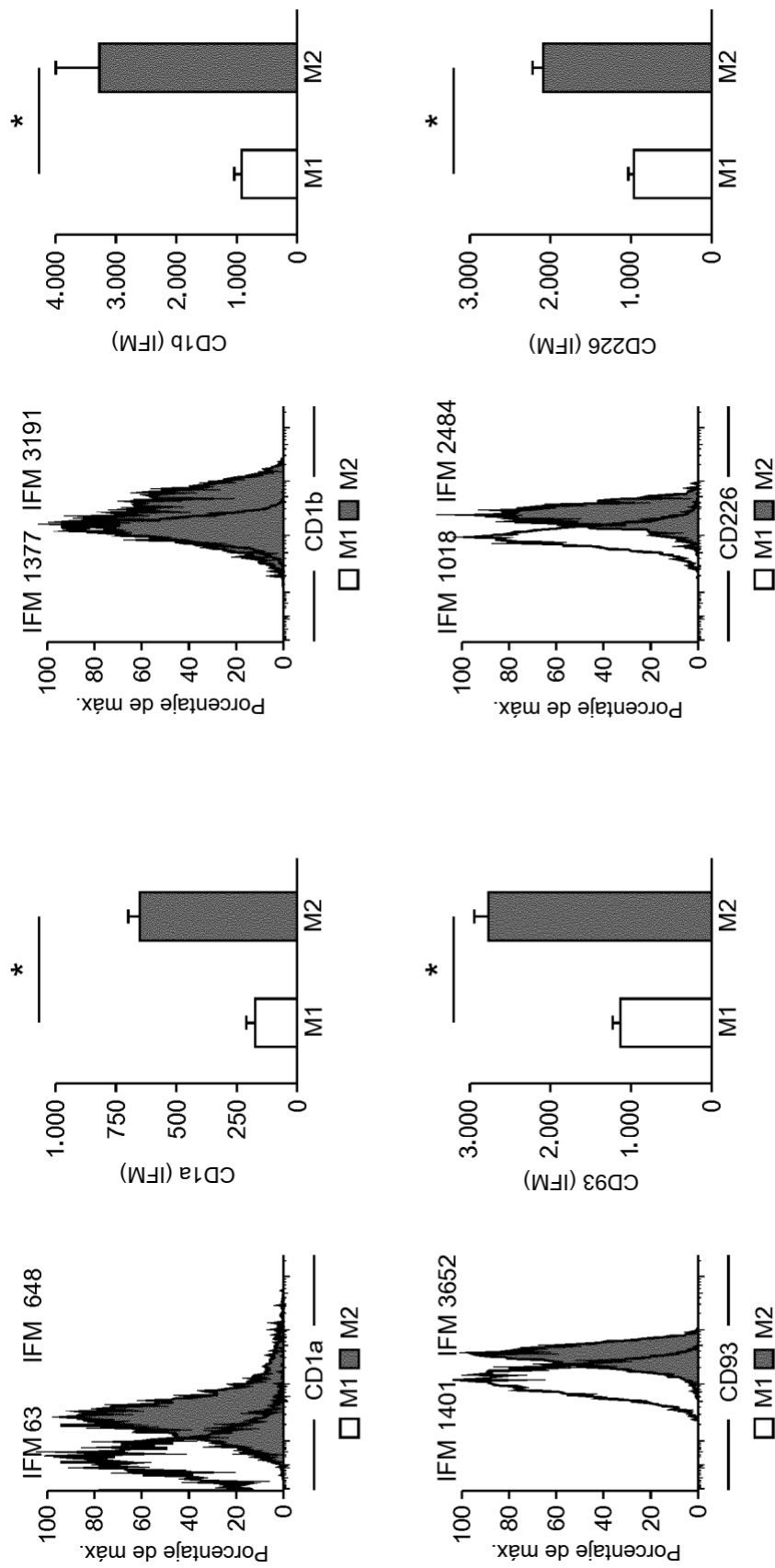


Fig. 14b