



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 012**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07004186 .8**

96 Fecha de presentación : **28.02.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1826279**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2007**

54 Título: **Detección y control de calidad de linfocitos T reguladores a través del análisis de metilación del ADN del gen FoxP3.**

30 Prioridad: **28.02.2006 US 777631 P**

73 Titular/es: **Charite-Universitätsmedizin Berlin
Schumannstrasse 20/21
10117 Berlin, DE
EPIONTIS GmbH**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2011

72 Inventor/es: **Hühn, Jochen;
Flöss, Stefan;
Hamann, Alf;
Olek, Sven y
Baron, Udo**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2011

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 012 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

Detección y control de calidad de linfocitos T reguladores a través del análisis de metilación del ADN del gen FoxP3

La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para detectar linfocitos T reguladores CD25⁺CD4⁺ positivos para FoxP3 de un mamífero, que comprende analizar el estado de metilación de al menos una posición CpG en la región 5' cadena arriba del comienzo de transcripción, regiones promotoras, intrones y/o límites exón/intrón del gen *Foxp3* o un gen ortólogo o parálogo del mismo. Además, la presente invención se refiere a un kit para realizar los procedimientos anteriores así como usos respectivos.

Los linfocitos T reguladores desempeñan un papel importante para el mantenimiento de tolerancia inmunológica suprimiendo la acción de células efectoras autorreactivas, lo que les hace dianas interesantes para aplicaciones terapéuticas. Por lo tanto, estas células están implicadas de forma crítica en la prevención del desarrollo de reacciones autoinmunes (Sakaguchi, Nat Immunol 6:345-352, 2005).

El factor de transcripción Foxp3 se expresa específicamente en linfocitos T reguladores y se cree que actúa como un interruptor maestro para el desarrollo y función de estas células. Recientemente, se ha demostrado que la expresión ectópica de Foxp3 en linfocitos T convencionales confiere actividad supresora (Fontenot y Rudensky, Nat Immunol 6:331-337, 2005).

La vasta mayoría de linfocitos T reguladores Foxp3⁺ se generan durante el desarrollo de linfocitos T dentro del timo y se cree que representan un linaje individual. Además, también se ha indicado que surgen linfocitos T reguladores Foxp3⁺ a partir de linfocitos T convencionales tanto *in vitro* como *in vivo* tras reconocimiento del antígeno en condiciones tolerogénicas. En todos los casos la expresión de Foxp3 es característica para el desarrollo de linfocitos T reguladores.

Generalmente se desconoce qué señales conducen a la expresión de Foxp3, aunque se ha indicado que algunos factores incluyendo TGF- β inducen expresión de Foxp3 en linfocitos T convencionales. Sin embargo, no está claro hasta el momento si estas condiciones solo conducen a una expresión transitoria o a diferenciación terminal en linfocitos T reguladores Foxp3⁺, lo que se requiere para función supresora a largo plazo de estas células. Por lo tanto, el punto de partida para la presente invención fue el análisis de mecanismos que conducen a expresión estable del factor de transcripción de Foxp3 en linfocitos T reguladores.

El documento WO 02/090600 describe moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican Fkhsf, así como formas mutantes de la misma. También se describen vectores de expresión adecuados para expresar tales moléculas de ácido nucleico y células huésped que contienen tales vectores de expresión. También se describen compuestos y procedimientos farmacéuticos para identificar tales compuestos que pueden modular el sistema inmune. Además se proporcionan procedimientos para identificar proteínas reguladas por Ecurfina y proteínas que inducen o inhiben la expresión de Foxp3.

Chen y col. (Chen L, Cohen AC, Lewis DB. Impaired Allogeneic Activation and T-helper 1 Differentiation of Human Cord Blood Naive CD4 T Cells. Biol Blood Marrow Transplant. Feb 2006;12(2):160-71.) describen la expresión de proteína FoxP3 como un marcador para linfocitos T reguladores CD25(alto) CD4.

El documento EP-A-1 213 600 describe materiales para la generación de identificadores de metilación de células particulares.

El documento WO2004/050706 desvela los fenotipos de expresión de linfocitos T reguladores. Un fenotipo se define por la expresión combinada de FoxP3 además de CD4, CD25 y CCR5. Los análisis se basan en FACS y/o análisis de anticuerpo.

El documento US2003/170648 desvela un procedimiento para identificar un compuesto que modula el nivel de expresión de escurfina (FoxP3) usando un gen indicador ligado a un promotor de escurfina en el fondo de un gen foxP3 mutado.

Aunque casi todas las células en un individuo contienen exactamente el mismo complemento de código de ADN, los organismos superiores deben imponer y mantener diferentes patrones de expresión génica en los diversos tipos tisulares. La mayor parte de la regulación génica es transitoria, dependiendo del estado actual de la célula y cambios en estímulos externos. La regulación consistente, por otro lado, es un papel principal de epigenética, patrones reguladores hereditarios que no alteran la codificación genética básica del ADN. La metilación de ADN es la forma arquetípica de regulación epigenética; sirve como la memoria estable para células y realiza un papel crucial en el mantenimiento de identidad a largo plazo de diversos tipos celulares.

La diana principal de metilación es la secuencia de dos nucleótidos Citosina-Guanina (un "sitio CpG"); dentro de este contexto la citosina (C) puede experimentar una simple modificación para convertirse en 5-metil-citosina. En el genoma humano, la secuencia CG es mucho menos común de lo esperado excepto en ciertos grupos relativamente densos llamados "islas de CpG". Las islas de CpG se asocian frecuentemente con promotores génicos y se ha estimado que más de la mitad de los genes humanos tienen islas de CpG (Antequera y Bird, Proc Natl Acad Sci U S

A. 90:11995-9, 1993).

La metilación aberrante de ADN frecuentemente acompaña la transformación de células sanas a cancerosas. Entre los efectos observados están hipometilación en todo el genoma, metilación aumentada de genes supresores de tumores e hipometilación de muchos oncogenes (revisado por Jones y Laird, *Nature Genetics* 21:163-167, 1999; Esteller, *Oncogene* 21:5427-5440, 2002; Laird, *Nature Reviews/Cancer* 3:253-266, 2003). Se ha reconocido que los perfiles de metilación son específicos de tumor (es decir, cambios en el patrón de metilación de genes particulares o incluso CpG individuales son diagnósticos de tipos tumorales particulares) y existe ahora una colección exhaustiva de marcadores de diagnóstico para cánceres de vejiga, mama, colon, esófago, estómago, hígado, pulmón y próstata (resumidos por Laird, *Nature Reviews/Cancer* 3:253-266, 2003).

10 El control epigenético por metilación es esencial para el desarrollo temprano incluyendo embriogénesis, inactivación del cromosoma X e impronta (silenciamiento monoalélico) del alelo paterno o materno (Erlach, *J Cellular Chem* 88: 899-910, 2003). También existe una clase de genes que se activa en la línea germinal, pero se silencia por metilación en células somáticas (Bird, *Genes and Dev* 16:6-21, 2002; Li, *Nature Reviews/Genetics* 3:662-673, 2002).

15 La metilación específica de tejido también actúa en la regulación de etapas/tipos celulares adultos y en algunos casos se ha establecido una relación causal entre metilación y expresión génica. Las siguiente es una lista parcial de genes, para los que los cambios de metilación están fuertemente implicados en el control de la expresión génica de una manera específica de tejido: lactato deshidrogenasa C (testículos); Receptor de oxitocina (sangre e hígado); Tirosina aminotransferasa (hígado); GFAP (astrocitos) y Leucosialina (leucocitos). En otros casos, la metilación puede ser un producto secundario de alguna otra regulación primaria o se requiere para bloquear el gen en el estado "inactivado" (Erlach, *J Cellular Chem* 88:899-910, 2003). Para las presentes aplicaciones (identificación celular/tisular), no se requiere una relación causal, únicamente una fuerte correlación entre patrones de metilación y tipos celulares.

Un ejemplo previamente publicado para una modificación específica tal de estado celular y tipo celular de ciertas regiones génicas se encuentra durante el compromiso de linaje de linfocitos T a linfocitos T auxiliares (Th1 o Th2). Los linfocitos T CD4⁺ vírgenes (no estimulados) se activan tras encontrarse con un antígeno y pueden comprometerse a destinos celulares alternativos a través de estimulación adicional por interleucinas. Los dos tipos de linfocitos T auxiliares muestran patrones recíprocos de expresión génica; Th1 produce Interferon-gamma (IFN- γ) y silencia IL-4, mientras que Th2 produce IL-4 y silencia IFN- γ (Ansel y col., *Nature Immunol* 4:616-623, 2003). Para ambos destinos celulares alternativos, la expresión de estos genes se relaciona inversamente con metilación de sitios CpG proximales. En linfocitos T vírgenes y Th2 el promotor de IFN- γ está metilado, pero no en linfocitos Th1 en los que se expresa IFN- γ (Attwood y col., *CMLS* 59:241-257, 2002). Por el contrario, la región transcrita completa de IL-4 se desmetila en condiciones inductoras de Th2, lo que se correlaciona fuertemente con transcripción eficaz de IL-4. En linfocitos Th1, esta desmetilación extensiva no se produce, en su lugar regiones no transcritas particulares se metilan fuertemente de forma gradual e IL-4 no se expresa (Lee y col., *Immunity* 16:649-660, 2002). Además, Bruniquel y Schwartz (*Nat Immunol.* 4:235-40, 2003) han demostrado que en linfocitos T vírgenes, el promotor de IL-2 está fuertemente metilado e inactivo, pero después de la activación del linfocito T virgen, el gen de IL-2 experimenta una desmetilación rápida y específica en seis CpG consecutivos. Esta alteración en los patrones de metilación se produce conjuntamente con diferenciación celular y producción aumentada del producto IL-2.

40 Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento mejorado de análisis de expresión y en particular análisis de expresión basado en análisis de la metilación de ADN como una herramienta superior que puede complementar o reemplazar las metodologías convencionales como un indicador de tipo y estado celular en vertebrados, para identificar de forma fiable linfocitos T reguladores positivos para FoxP3, preferentemente linfocitos T reguladores CD25⁺CD4⁺, de un mamífero y/o en un mamífero.

Sumario de la invención

45 De acuerdo con un primer aspecto de la misma, la presente invención resuelve el objeto anterior proporcionando un procedimiento para detectar linfocitos T reguladores CD25⁺CD4⁺ estables positivos para FoxP3 de un mamífero, que comprende analizar el estado de metilación de al menos una posición CpG en la región 5' cadena arriba del comienzo de transcripción, regiones promotoras, intrones y/o límites de exón/intrón del gen foxp3 o un gen ortólogo o parálogo del mismo. Dicho procedimiento se realiza *in vitro*. El análisis de la accesibilidad del locus Foxp3 proporciona información adicional, además de la mera expresión de Foxp3, de en qué medida se ha producido una conversión permanente a linaje de linfocitos T reguladores (véase también posteriormente en el contexto de linfocitos T reguladores inducidos por TGF- β).

55 Los inventores han identificado una región particular dentro del gen Foxp3, que está implicada funcionalmente en la regulación de la expresión de Foxp3 estable en linfocitos T reguladores. Esta región contiene muchos motivos CpG, que presentan un estado de metilación diferencial cuando las células que expresan Foxp3 (preferentemente CD25⁺CD4⁺) se comparan con células que no expresan Foxp3 (preferentemente CD25⁺CD4⁺) si, por ejemplo, se usa el procedimiento de secuenciación de bisulfito. Los inventores pudieron demostrar que en células Foxp3⁺ los motivos CpG estaban casi completamente desmetilados (es decir en más del 70 %, preferentemente el 80 %, preferentemente más del 90 % y más preferentemente más del 95 %), mientras que los mismos motivos están

completamente metilados en células Foxp3⁻. La metilación diferencial de los motivos CpG dentro de la región anteriormente mencionada se correlaciona fuertemente con expresión de Foxp3. Por lo tanto, la determinación del estado de metilación del locus *foxp3* podría convertirse en una herramienta valiosa para identificar poblaciones estables de linfocitos T reguladores requerida para aplicación clínica en el tratamiento de enfermedad autoinmune, rechazo de trasplante o alergia.

El trastorno linfo proliferativo de ratones scurfy se recupera completamente por complementación transgénica con un fragmento genómico de 30,8 kb que contiene el gen Foxp3 de ratones de tipo silvestre (Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. Nat Genet. Ene 2001;27(1):68-73.). Esto indica que todos los elementos reguladores requeridos para expresión de Foxp3 apropiada se localizan dentro del transgen incluyendo el gen completo así como 12,5 kb y 2,8 kb de secuencias flanqueantes 5' y 3', respectivamente. Los inventores por lo tanto centraron el análisis de modificaciones epigenéticas en secuencias de la región de 30,8 kb y regiones específicas seleccionadas para análisis de metilación basándose en densidad de CpG. Tras PCR electrónica, se diseñaron cebadores para producir cuatro amplicones (véase Figura 1): Los amplicones solapantes 1 y 2 se localizan cadena arriba desde el exón 1, los amplicones 3 y 4 se alinean con el séptimo intrón. No se observaron regiones ricas en CpG dentro del promotor de Foxp3 predicho localizado en el extremo 5' potencial del exón -2b, 6,1 kb cadena arriba desde el primer exón codificante (Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. Nat Genet. Ene 2001; 27(1):68-73.).

En el contexto de la presente invención, el término "gen" significará una región del ADN cromosómico que codifica una cierta proteína, tal como, FoxP3 y contiene otros elementos genéticos que son responsables de la regulación de dicho gen. Por lo tanto, un gen incluye también intrones, potenciadores, secuencias promotoras y la región 5' no traducida del gen. En el presente caso, el gen no incluirá solamente las secuencias según se proporcionan en Brunkow y col. (Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. Nat Genet. Ene 2001;27(1):68-73. Número de acceso AF277993), sino que también incluye las regiones no traducidas cadena arriba y cadena abajo de la misma, como se representa en la Figura 4 como está disponible en la base de datos con Número de acceso NC_000023 y en la Figura 4.

Inicialmente, todos los análisis como se realizan para la presente invención se han realizado en el sistema murino. Sin embargo, la región que muestra metilación diferencial de motivos CpG entre células Foxp3⁺ y Foxp3⁻, está altamente conservada entre mamíferos, en particular entre ratones y seres humanos. Además, los primeros experimentos mostraron que en el sistema humano los mismos motivos CpG y/u homólogos están desmetilados como en linfocitos T reguladores *foxp3*⁺ murinos. En el contexto de la presente invención, este hecho se describe por los términos gen "ortólogo" o "parálogo". Un "ortólogo" es un gen en dos o más especies que ha evolucionado a partir de un ancestro común y también se llama un gen ortólogo. En el contexto de la presente invención, FoxP3 (caja forkhead P3) de *Homo sapiens* es por lo tanto un ortólogo del gen y/o proteína Foxp3 (caja forkhead P3) de *Mus musculus*. Otros ortólogos son LOC491876 de *C. familiaris* (similar a la proteína de caja Forkhead P3) y LOC317382 *R. norvegicus* (similar a escurfina). "Parálogos" son genes relacionados por duplicación dentro de un genoma y también se llaman genes parálogos. Los ortólogos conservan la misma función en el transcurso de la evolución, mientras que los parálogos evolucionan a nuevas funciones, incluso si estas están relacionadas con la original. El término "parálogo" incluye un "pseudogen" que es una secuencia de nucleótidos que es similar a un gen normal, pero no produce un producto final funcional. Existen dos variantes de pseudogenes. La primera requiere que el producto final sea una proteína. La segunda permite que el producto final sea un ARN.

Basándose en la información proporcionada en el presente documento, el experto en la materia será fácilmente capaz de comparar los genes ortólogos o parálogos (por ejemplo usando un programa informático para alinear la secuencias, tal como el programa fasta), y de identificar regiones y/o posiciones CpG que puedan hallarse en las mismas regiones y/o incluso en las mismas posiciones equivalentes en los (ambos) genes. De acuerdo con la presente invención, estas regiones y/o posiciones CpG se consideran ortólogas o parálogas. Habitualmente, un alineamiento se basa en el nivel de identidad de secuencia entre los dos (o más) fragmentos de ADN que se analizan. Como un ejemplo preferido de acuerdo con la presente invención, un tramo de 384 pb que se metila diferencialmente en la región abarcada por los amplicones 1 y 2 (como se describe en el presente documento), pero no la región abarcada por los amplicones 3 y 4 está altamente conservado entre ratones y hombres (identidad de secuencia del 80,7 %), lo que sugiere que en ambos mamíferos pueden encontrarse partes funcionalmente importantes que están sujetas ambas a regulación epigenética. Como otro ejemplo preferido de acuerdo con la presente invención, pudo identificarse la región desmetilada específica de Treg (TSDR). Otros niveles de identidad de secuencia son preferentemente aproximadamente 75 %, más preferentemente aproximadamente 80 % y más preferentemente aproximadamente 90 %, de un fragmento dado.

En una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la presente invención, dicho análisis del estado de metilación comprende purificación con al menos uno de los pares cebadores seleccionados de SEC ID N° 1 y 2; SEC ID N° 3 y 4; SEC ID N° 5 y 6; SEC ID N° 7 y 8, SEC ID N° 9 y 10; SEC ID N° 11 y 12; SEC ID N° 13 y 14; SEC ID N° 15 y 16; SEC ID N° 17 y 18; SEC ID N° 19 y 20; SEC ID N° 21 y 22; SEC ID N° 23 y 24; SEC ID N° 25 y 26;

SEC ID N° 27 y 28; SEC ID N° 29 y 30, y pares de cebadores ortólogos o parálogos de los mismos. Preferentemente, la amplificación implica una enzima polimerasa, una PCR o reacción de amplificación química u otros procedimientos de amplificación conocidos para el experto en la materia como se describen posteriormente, por ejemplo en el contexto de MSP, HeavyMethyl o MethylLight. Con la amplificación, se producen los amplicones 1 a 4 o amplicones humanos 1 a 11 (como se describe en el presente documento) u ortólogos o parálogos de los mismos que son “herramientas” particularmente preferidas para realizar el procedimiento o los procedimientos de acuerdo con la presente invención. En consecuencia, un oligómero de acuerdo con cualquiera de SEC ID N°: 1 a 30 o un amplicón como se amplifica por un par de cebadores seleccionado de SEC ID N° 1 y 2; SEC ID N° 3 y 4; SEC ID N° 5 y 6; SEC ID N° 7 y 8, SEC ID N° 9 y 10; SEC ID N° 11 y 12; SEC ID N° 13 y 14; SEC ID N° 15 y 16; SEC ID N° 17 y 18; SEC ID N° 19 y 20; SEC ID N° 21 y 22; SEC ID N° 23 y 24; SEC ID N° 25 y 26; SEC ID N° 27 y 28; SEC ID N° 29 y 30, o un oligómero o amplicón ortólogo o parólogo constituyen realizaciones preferidas de la presente invención. Se prefiere particularmente el par de cebadores SEC ID N°: 17 y 18 y el amplicón humano 5 (“Amp5”).

Basándose en la información anterior y los datos que se obtienen del sistema murino, pueden diseñarse pares de cebadores ortólogos o parálogos por el experto en la materia que tengan una identidad de secuencia con los cebadores anteriores de preferentemente aproximadamente el 75 %, más preferentemente aproximadamente el 80 % y más preferentemente aproximadamente el 90 %. Se prefiere particularmente un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que dicho análisis del estado de metilación comprende amplificación con al menos uno de los pares de cebadores seleccionados de SEC ID N° 1 y 2; SEC ID N° 3 y 4; SEC ID N° 15 y 16; SEC ID N° 17 y 18, SEC ID N° 19 y 20; SEC ID N° 21 y 22; SEC ID N° 23 y 24; SEC ID N° 29 y 30; y pares de cebadores ortólogos o parálogos de los mismos.

Se prefiere adicionalmente un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que el análisis del estado de metilación comprende analizar el estado de metilación de al menos una posición CpG seleccionada del grupo que consiste en las posiciones de nucleótidos 38, 74, 90, 124, 151, 156, 205, 224, 228, 236, 298 y 368 del amplicón 2 como se amplifica por el par de cebadores SEC ID N° 1 y 2, posiciones de nucleótidos 158, 180, 308, 344, 360, 394, 421 y 426 del amplicón 1 como se amplifica por el par de cebadores SEC ID N° 3 y 4, las posiciones de nucleótidos 37, 69, 311, 315, 319, 338 y 371 del amplicón 4 como se amplifica por el par de cebadores SEC ID N° 5 y 6, las posiciones de nucleótidos 93, 170, 173, 176 y 281 del amplicón 3 como se amplifica por el par de cebadores SEC ID N° 7 y 8 y posiciones CpG ortólogas o parálogas de las mismas.

Se prefiere aún más un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que dicho análisis del estado de metilación comprende analizar el estado de metilación de al menos una posición de CpG seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 38, 74, 90, 124, 156, 205, 224, 236, 298 y 368 del amplicón 2 como se amplifica por el par de cebadores SEC ID N°: 1 y 2, posiciones 180, 308, 344 y 394 del amplicón 1 como se amplifica por el par de cebadores SEC ID N°: 3 y 4 y posiciones CpG ortólogas y parálogas de las mismas. Pudo mostrarse en los experimentos que estas posiciones estaban principalmente desmetiladas en los linfocitos T reguladores. El experto en la materia será capaz adicionalmente de seleccionar subconjuntos específicos de posiciones CpG para minimizar la cantidad de sitios a analizar, por ejemplo, todos los sitios presentes en el amplicón 1 o todos los sitios presentes en el amplicón 2 o posiciones CpG ortólogas o parálogas de las mismas.

Para analizar el estado de metilación de las posiciones CpG, puede usarse cualquier procedimiento conocido para analizar metilación de ADN. En una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la presente invención, el análisis del estado de metilación comprende un procedimiento seleccionado de digestiones enzimáticas específicas de metilación, secuenciación de bisulfito, análisis seleccionado de metilación del promotor, metilación de islas de CpG, MSP, HeavyMethyl, MethylLight, Ms-SNuPE u otros procedimientos basados en una detección de ADN amplificado. Estos procedimientos se conocen bien por el experto en la materia y pueden encontrarse en la bibliografía respectiva.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención puede realizarse con cualquier mamífero que tenga el gen *foxp3* o un ortólogo o parálogo del mismo. Se prefiere un procedimiento de acuerdo con la presente invención en el que dicho mamífero es un ratón, rata, mono o ser humano.

En otro aspecto de la presente invención, el procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende adicionalmente una inducción con TGF- β . Una cuestión crítica para la aplicación de linfocitos T reguladores en enfoques terapéuticos es la disponibilidad de grandes números de células. Publicaciones recientes han indicado que los linfocitos T CD25⁻CD4⁺ convencionales pueden convertirse a linfocitos T reguladores Foxp3⁺ por estimulación en presencia de TGF- β (Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGFbeta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. Dic 2003 15;198(12):1875-86.), (Park HB, Paik DJ, Jang E, Hong S, Youn J. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4⁺CD25⁻ T cells. *Int Immunol*. Ago 2004;16(8):1203-13. Epub 5 Jul 2004), (Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, Zhang H, Ding Y, Bromberg JS. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant*. Oct 2004; 4(10):1614-27.), (Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and downregulation of Smad7. *J Immunol*. 1 Mayo 2004; 172(9):5149-53.), (Wan YY, Flavell RA. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 5 Abr 2005;102(14):5126-31. Epub 28 Mar 2005.), (Fantini MC,

5 Becker C, Tubbe I, Nikolaev A, Lehr HA, Galle PR, Neurath MF. TGF-(beta) induced Foxp3+ regulatory T cells suppress Th1-mediated experimental colitis. Gut. 14 Sep 2005). Sin embargo, la estabilidad y eficacia *in vivo* de estas células no se ha ensayado minuciosamente hasta el momento. El análisis de la accesibilidad del locus de Foxp3 podría proporcionar una pista adicional, además de la mera expresión de FoxP3, de en qué grado se produjo una conversión permanente a linaje de linfocitos T reguladores. Los inventores analizaron por lo tanto el estado de metilación del locus de Foxp3 de linfocitos T CD25⁻CD4⁺, que se había activado y cultivado durante 5 días en presencia de TGF-β. El día 5, las células de control cultivadas en condiciones Th1 mostraron menor expresión de Foxp3 (<2 %), mientras que casi el 95 % de las células estimuladas en presencia de TGF-β eran Foxp3⁺ con desmetilación parcial (Figura 2A). Resulta interesante que una desmetilación parcial se observó solamente en las células estimuladas en presencia de TGF-β.

10 Además, se describe en el presente documento un procedimiento para diagnosticar el estado inmune de un mamífero, que comprende las etapas de a) obtener una muestra que contenga linfocitos T de dicho mamífero a diagnosticar, b) analizar el estado de metilación de al menos una posición de CpG en el gen foxp3 o un gen ortólogo o parálogo del mismo de acuerdo con la presente invención en dichos linfocitos T, c) identificar la cantidad de linfocitos T reguladores presentes en dicha muestra basándose en dicho estado de metilación y d) concluir el estado inmune de dicho mamífero basándose en dicha cantidad identificada. En un aspecto de este procedimiento particular, la población total de linfocitos T en una muestra (que contiene linfocitos T reguladores y no reguladores) se analiza con respecto a su estado de metilación en el gen foxp3. Basándose en el resultado de la frecuencia de metilación global de los sitios, puede determinarse la relación y/o cantidad de linfocitos T reguladores dentro de la población analizada. A partir de dicho resultado, puede concluirse el estado inmune y/o estado de linfocitos T del mamífero diagnosticado. El procedimiento puede realizarse *in vivo* y/o *in vitro*. En general, todas las muestras biológicas pueden usarse, siempre que contengan linfocitos T adecuados. Se prefiere un procedimiento en el que dicha muestra se selecciona de una muestra sanguínea, una muestra de linfocitos sanguíneos o una fracción de los mismos.

15 El procedimiento puede realizarse con cualquier mamífero que tenga el gen foxp3 o un ortólogo o parálogo del mismo. Se prefiere un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que dicho mamífero es un ratón, rata, mono o ser humano. Se prefiere un procedimiento en el que dicho mamífero sea un paciente que padece una enfermedad seleccionada de enfermedades autoinmunes, efectos adversos en receptores de alotrasplantes, enfermedades tumorales, cáncer de ovario, enfermedad de injerto contra huésped crónica, asma alérgico, esclerosis múltiple y síndrome IPEX. Estas enfermedades ya se han descrito en el presente documento.

20 Se prefiere adicionalmente un procedimiento en el que la cantidad de linfocitos T reguladores corresponde a una desmetilación de las posiciones CpG como se analizó en al menos 80 %, preferentemente 90 % y más preferentemente 95 %. Se prefiere aún más un procedimiento que comprende adicionalmente medir y/o controlar la cantidad o relación de dichos linfocitos T reguladores en respuesta a sustancias químicas y/o biológicas que modulan la expresión de foxp3 en el linfocito T regulador. Es decir, los cambios en la cantidad o relación de linfocitos T reguladores que están causados por, por ejemplo, el tratamiento de una enfermedad (por ejemplo como se ha descrito en el presente documento) y el éxito y/o progreso de dicho tratamiento en términos de un efecto en los linfocitos T reguladores puede seguirse usando este procedimiento. Un seguimiento del patrón de metilación de linfocitos T basado en el marcador en el presente documento apuntará a cambios en las células que se deben a una respuesta a dichas sustancias químicas y/o biológicas, en algunos casos incluso antes de que pueda observarse un cambio fenotípico.

25 Además, se describe un procedimiento para determinar la idoneidad de linfocitos T reguladores expandidos o generados *in vitro* para una transferencia a un paciente, que comprende el procedimiento de acuerdo con la presente invención y detectar si las posiciones CpG analizadas están desmetiladas en al menos 80 %, preferentemente 90 % y más preferentemente 95 %. El procedimiento puede realizarse *in vitro* y/o *in vivo*. Por ejemplo, los linfocitos T que parecen mostrar una expresión de foxp3 modificada, en particular un descenso, habitualmente no se consideran estables y no se usarán más.

30 En otro aspecto más de la presente invención, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar sustancias químicas y/o biológicas que modulan la expresión de foxp3 en un linfocito T, que comprende poner en contacto una o más de dichas sustancias químicas y/o biológicas con un linfocito T, realizar el procedimiento de acuerdo con la presente invención como se ha descrito anteriormente y detectar si dicha sustancia química y/o biológica modula la metilación de las posiciones CpG analizadas. El procedimiento se realiza *in vitro*. En este aspecto, la presente invención abarca un procedimiento, en ocasiones denominado un "procedimiento de exploración" que busca identificar sustancias químicas y/o biológicas que modulan la expresión de foxp3 que pueden usarse como puntos de partida para el desarrollo de medicación específica de linfocitos T reguladores y composiciones farmacéuticas respectivas. El presente procedimiento se basa en el hecho de que está bien aceptado que el gen foxp3 desempeña un papel central para el desarrollo de linfocitos T reguladores. Por lo tanto, los factores que modulan la expresión de foxp3 también son herramientas interesantes para tratar enfermedades autoinmunes o receptores de alotrasplantes. Incluso los factores que evitan la expresión de Foxp3 son interesantes para el tratamiento de pacientes con tumor, en los que se ha mostrado que los linfocitos T reguladores Foxp3⁺ evitan una respuesta antitumoral fuerte. Tales factores, que conducen a una modificación estable de la expresión de Foxp3, pueden detectarse con el procedimiento descrito en la presente invención. Además, pueden identificarse factores

que pueden potenciar la diferenciación de linfocitos T reguladores y conducir a un alivio de trastornos alérgicos y autoinmunes con el presente procedimiento. Las sustancias químicas y/o biológicas que son adecuadas como compuesto de exploración se conocen para el experto en la materia y, por ejemplo, incluyen moléculas pequeñas, péptidos y proteínas y anticuerpos o fragmentos de los mismos. Además, la exploración puede realizarse usando una biblioteca de compuestos comercial, óptimamente junto con automatización adecuada, tal como un robot. En una realización preferida del procedimiento para identificar sustancias químicas y/o biológicas, dicha sustancia proporciona una desmetilación de las posiciones CpG como se ha analizado en al menos 80 %, preferentemente 90 % y más preferentemente 95 %.

La expresión de FoxP3 se describe como asociada con pronóstico negativo en cáncer de ovario (Wolf, D., y col. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. Clin. Cancer Res. 11 (23), 8326-8331 (2005)). Los niveles de expresión altos de FoxP3 se asocian con cáncer de ovario. Además, la expresión génica del factor de transcripción de linfocitos T reguladores FOXP3 se redujo en pacientes con enfermedad de injerto contra huésped crónica (Zorn, E., y col. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. Blood 106 (8), 2903-2911 (2005)). Además, se ha descrito un papel de FoxP3 en asma alérgico (Schmidt-Weber, C.B. y Blaser, K. The role of the FOXP3 transcription factor in the immune regulation of allergic asthma. Curr Allergy Asthma Rep 5 (5), 356-361 (2005)). El síndrome IPEX se caracteriza por el desarrollo de autoinmunidad sistémica abrumadora en el primer año de vida dando como resultado la tríada habitualmente observada de diarrea acuosa, dermatitis eccematosa y endocrinopatía vista más habitualmente como diabetes melitus insulino dependiente. La mayoría de los individuos tienen otros fenómenos autoinmunes que incluyen anemia positiva de Coombs, trombocitopenia autoinmune, neutropenia autoinmune y nefropatía tubular. La mayoría de los hombres afectados mueren en el primer año de vida de trastornos metabólicos o sepsis; algunos han sobrevivido hasta la segunda y tercera década. Hasta ahora, el diagnóstico está basado en hallazgos clínicos y *foxp3* es el único gen que actualmente se sabe que está asociado con el síndrome IPEX. Aproximadamente el 60 % de los hombres con síndrome IPEX tienen mutaciones identificadas en el gen *foxp3*. Recientemente, la expresión de *foxp3* se ligó además a enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple (MS) (Huan J, Culbertson N, Spencer L, Bartholomew R, Burrows GG, Chou YK, Bourdette D, Ziegler SF, Offner H, Vandenbark AA. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. J Neurosci Res. 1 Jul 2005;81(1): 45-52.).

Las referencias anteriores claramente establecen una conexión entre la expresión de *foxp3* y enfermedades autoinmunes, efectos adversos en receptores de alotrasplantes, enfermedades tumorales, cáncer de ovario, enfermedad de injerto contra huésped crónica, asma alérgica y síndrome IPEX. Por lo tanto, se describe adicionalmente en el presente documento un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades que se asocian con la expresión aberrante del gen *foxp3*, que comprende el procedimiento de acuerdo con la presente invención y detectar si las posiciones CpG analizadas están desmetiladas en al menos 80 %, preferentemente 90 % y más preferentemente 95 %, en el que las enfermedades se seleccionan de enfermedades autoinmunes, efectos adversos en receptores de alotrasplantes, enfermedades tumorales, cáncer de ovario, enfermedad de injerto contra huésped crónica, asma alérgica y síndrome IPEX. El presente procedimiento puede realizarse *in vitro* y/o *in vivo* y posibilita una determinación más específica del parámetro FoxP3, puesto que la expresión temporal de FoxP3, especialmente en el sistema humano, se ha detectado también en linfocitos T no reguladores activados (Ziegler SF. FOXP3: Of Mice and Men. Annu Rev Immunol. 1 Dic 2005).

Otro aspecto preferido de la presente invención se refiere a un kit para identificar linfocitos T reguladores basándose en el análisis del estado de metilación de posiciones CpG en el gen *foxp3*, que comprende materiales para realizar un procedimiento de acuerdo con la presente invención. En una realización preferida de acuerdo con la presente invención, el kit comprende a) un reactivo bisulfito y b) materiales para el análisis de metilación de posiciones CpG seleccionadas de las posiciones que consisten en las posiciones 38, 74, 90, 124, 156, 205, 224, 236, 298 y 368 del amplicón 2 como se amplificó por el par de cebadores SEC ID N° 1 y 2, las posiciones 180, 308, 344 y 394 del amplicón 1 como se amplificó por el par de cebadores SEC ID N°: 3 y 4, las posiciones en el amplicón 5 como se amplificó por el par de cebadores SEC ID N°: 17 y 18 y posiciones CpG ortólogas o parálogas de las mismas. El experto en la materia será capaz además de seleccionar materiales para subconjuntos específicos de posiciones CpG para minimizar la cantidad de sitios a analizar, por ejemplo todos los sitios presentes en el amplicón 1 o todos los sitios presentes en el amplicón 2 o todos los sitios presentes en el amplicón 5 o posiciones CpG ortólogas o parálogas de las mismas. El kit puede ser un kit de diagnóstico.

Los kits de acuerdo con la presente invención también pueden contener: 1. Agentes químicos (bisulfito, etc.) para procesar las muestras celulares; 2. Protocolos de procedimiento; 3. Sondas oligonucleotídicas, amplicones, bloqueadores o cebadores de extensión de acuerdo con la presente invención que detectarán marcadores relevantes para un tipo celular particular. Los oligonucleótidos se construirían para generar una señal en una plataforma de detección habitualmente disponible, tal como PCR a Tiempo Real (RT-PCR) o Extensión de Base Sencilla (SBE). Cada señal indica el nivel de metilación en un sitio diana particular en la muestra. Como alternativa, podrían producirse sondas de acuerdo con los ácidos nucleicos descritos para su uso en una microplaca; 4. Una herramienta bioinformática para procesar los resultados. Este, por ejemplo, software podría normalizar las señales de los datos sin procesar, contener una matriz de resultados para interpretación de la lectura o implementar diversos algoritmos que calculan, por ejemplo, las proporciones de tipos celulares o las predicciones de potencia.

Otro aspecto preferido más de la presente invención se refiere al uso de un kit de acuerdo con la presente invención para detectar y/o identificar linfocitos T reguladores positivos para FoxP3, preferentemente linfocitos T reguladores CD25⁺CD4⁺, en analogía a lo que se ha descrito anteriormente.

Se describe en el presente documento un procedimiento del tratamiento de enfermedades que están relacionadas con la expresión de Foxp3, tales como enfermedades autoinmunes, efectos adversos en receptores de alotrasplante, enfermedades tumorales, cáncer de ovario, enfermedad de injerto contra huésped crónica, asma alérgica, esclerosis múltiple y síndrome IPEX. El procedimiento comprende administrar una cantidad eficaz de linfocitos T reguladores positivos para FoxP3 estables, preferentemente linfocitos T reguladores CD25⁺CD4⁺ a dicho paciente que lo necesite. Se describe en la bibliografía cómo administrar una cantidad eficaz de linfocitos T reguladores positivos para FoxP3, preferentemente linfocitos T reguladores CD25⁺CD4⁺ estables (por ejemplo en Bharat A, Fields RC, Mohanakumar T. Regulatory T cell mediated transplantation tolerance. Immunol Res. 2006;33(3):195-212. June CH, Blazar BR. Clinical application of expanded CD4(+)25(+) cells. Semin Immunol. 31 Ene 2006; Khazaie K, von Boehmer H. The impact of CD4(+)CD25(+) Treg on tumor specific CD8(+) T cell cytotoxicity and cancer. Semin Cancer Biol. Abr 2006;16(2): 124-136. Epub 26 Ene 2006., y las referencias citadas en las mismas) y el experto en la materia será capaz de aplicar estos procedimientos. El término "tratamiento" también incluye una prevención de dichas enfermedades relacionadas con la expresión de Foxp3.

El análisis del estado de metilación de la región dentro del locus *foxp3* permite una predicción mejorada de si la población de células expresará de forma estable el gen FoxP3 o no. Por lo tanto, este procedimiento puede usarse como un control de calidad para linfocitos T reguladores expandidos o generados *in vitro* antes de su transferencia adoptiva a pacientes que padecen enfermedades autoinmunes o que han recibido un alotrasplante. Solamente si los motivos CpG están desmetilados en cierto grado es seguro que estas células expresarán de forma estable el gen Foxp3 y no perderán expresión de *foxp3* después de cierto periodo de tiempo. Este escenario tendría un resultado letal puesto que las células transferidas de forma adoptiva podrían convertirse de linfocitos T reguladores Foxp3⁺ a células efectoras patógenas, lo que podría conducir a un empeoramiento de la patología. Por lo tanto, se requiere absolutamente un control de calidad con respecto a la estabilidad del fenotipo regulador de células transferidas de forma adoptiva y puede conseguirse por el análisis del estado de metilación de la región anteriormente mencionada del locus de Foxp3.

En seres humanos, se ha descubierto desmetilación casi completa en Treg FOXP3+CD25^{alto}CD4⁺ naturales para varias regiones en el gen *FOXP3*. Por el contrario, la mayoría de las regiones están metiladas en los linfocitos T CD45RA+CD25-CD4⁺ vírgenes. Los linfocitos T CD4⁺ convencionales activados, que expresaban FOXP3 de forma transitoria, no presentaron desmetilación de ADN de *FOXP3*, lo que indica que la modificación de ADN solo se produce durante el desarrollo de Treg FOXP3+CD25^{alto}CD4⁺ estables. Los inventores concluyen que la desmetilación de ADN de *FOXP3* está ligada más a la función de Treg que a la expresión de proteína FOXP3. En consecuencia la determinación del estado de metilación de la región conservada ofrece un criterio fiable de identificación y cuantificación de Treg.

Puesto que la desmetilación del gen de *FOXP3* está asociada solamente con Treg que expresan de forma constitutiva FOXP3, permite un mejor sustituto para determinar el "verdadero" fenotipo regulador que analizar la expresión de proteína FOXP3.

En una realización de la presente invención, el estado de metilación del locus de Foxp3 se analizó por secuenciación de bisulfito y reveló diferencias sorprendentes entre linfocitos T reguladores CD25⁺CD4⁺ y linfocitos T CD25⁻CD4⁺ convencionales. Los amplicones 1 y 2 presentaron un alto grado de metilación (casi 100 %) dentro de linfocitos T CD25⁻CD4⁺ convencionales, pero estaban casi completamente desmetilados dentro de linfocitos T reguladores CD25⁺CD4⁺ (Figura 3). No se observaron diferencias para los amplicones 3 y 4 lo que muestra que el proceso de desmetilación no es un acontecimiento aleatorio, sino confinado a regiones definidas como se descubrió recientemente para el promotor de IL-2 (Bruniquel D, Schwartz RH. Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. Nat Immunol. Mar 2003;4(3):235-40. Epub 27 Ene 2003.). Sorprendentemente, un tramo de 364 pb del elemento metilado diferencialmente, pero no la región abarcada por los amplicones 3 y 4 está altamente conservado entre ratones y hombres (identidad de secuencia del 80,7 %), lo que sugiere que partes funcionalmente importantes están sometidas a regulación epigenética. Además, el análisis *in silico* de la región conservada predice varios sitios de unión para factor de transcripción, incluyendo ATF/CREB, Elk-1, Ets-1, Evi-1, Foxp3, NFAT, NF-κB, SMAD-4 y STAT-1, lo que sugiere que estos factores pueden estar implicados en la inducción de expresión de Foxp3 en linfocitos T reguladores CD25⁺CD4⁺. La región anterior parece estar particularmente implicada en la regulación de *foxp3*, quizá en forma de un promotor sin TATA (la caja TATA puede encontrarse cadena arriba de los amplicones). Además, parece existir corte y empalme alternativo en el gen *foxp3* (número de Acceso de Genbank DQ010327). Solamente los timocitos SP CD4 CD25⁺ pero no CD25⁻ presentaron motivos CpG desmetilados dentro de las regiones aparcadas por los amplicones 1 y 2. De nuevo, los CpG en los amplicones 3 y 4 estaban igualmente metilados. Resulta interesante que los timocitos SP CD4 CD25⁺ mostraron un grado ligeramente reducido de ADN desmetilado dentro de los amplicones 1 y 2 en comparación con los linfocitos T reguladores CD25⁺ CD4⁺ periféricos.

Como se esperaba, dentro de los linfocitos Th1 los motivos CpG estaban completamente metilados (Figura 2B). Por el contrario, el cultivo celular en presencia de TGF-β condujo a una desmetilación de los motivos CpG dentro de la

región abarcada por los amplicones 1 y 2, aunque el grado de desmetilación era menos pronunciado en comparación con timocitos SP CD4 CD25⁺ o linfocitos T reguladores CD4 CD25⁺. No obstante, incluso en linfocitos T reguladores inducidos por TGF- β los inventores pudieron observar una correlación entre la desmetilación del elemento conservado y la expresión de Foxp3.

5 En conclusión, el estado desmetilado de la región conservada en la evolución cadena arriba del exón -1 de *foxp3* parece estar ligado a un fenotipo de linfocito T regulador estable. Los hallazgos sugieren que se requiere un cierto grado de desmetilación de CpG dentro de este sitio para permitir la expresión estable de Foxp3 como se halló recientemente para IL-2 (Bruniquel D, Schwartz RH. Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol.* Mar 2003;4(3):235-40. Epub 27 Ene 2003.). Por lo tanto, la determinación de este parámetro constituye un marcador más fiable de conversión exitosa de linfocitos T convencionales a linfocitos T reguladores que la mera expresión temporal de Foxp3, puesto que la segunda, especialmente en el sistema humano, se ha detectado también en linfocitos T no reguladores activados (Ziegler SF. FOXP3: Of Mice and Men. *Annu Rev Immunol.* 1 Dic 2005).

15 Basándose en los datos murinos iniciales, se diseñaron varios amplicones que abarcaban regiones candidatas para metilación de ADN diferencial del gen *FOXP3* humano incluyendo elementos reguladores potenciales. El análisis de metilación de los 11 amplicones se realizó comparando linfocitos T CD25-CD45RA+CD4+ vírgenes humanos con Treg CD25altoCD45RA-CD4+ naturales de sangre periférica de tres donantes masculinos (donantes n° 1-3). La tinción de FOXP3 intracelular de subconjuntos clasificados por FACS reveló expresión de FOXP3 específica solamente en Treg CD25altoCD45RA-CD4+ (Figura 5A) de acuerdo con los hallazgos de otros laboratorios (Walker MR, Kasproicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest.* 2003;112: 1437-1443. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, Maeda M, Onodera M, Uchiyama T, Fujii S, Sakaguchi S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004;16:1643-1656. Roncador G, Brown P J, Maestre L, Hue S, Martinez-Torrecuadrada JL, Ling KL, Pratap S, Toms C, Fox BC, Cerundolo V, Powrie F, Banham AH. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol.* 2005;35:1681-1691).

30 Se descubrió que los CpG estaban metilados en ambos tipos celulares en la región 3' del gen (Amp 1 y 2 en la Figura 5B). Cadena arriba del exón 1, los CpG en ambos tipos celulares estaban desmetilados hasta el extremo 5' de una isla de CpG (Amp 9 y 10). En el extremo 5' del gen *FOXP3*, se observó metilación solamente en linfocitos T CD4+ vírgenes, mientras que tendían hacia desmetilación en los Treg (Amp 10 y 11). Se observaron diferencias sorprendentes en el patrón de metilación dentro del cuerpo del gen y regiones promotoras potenciales (Amp 3-8), en particular en una región altamente conservada entre mamíferos (Amp 5), para la que los inventores proponen el nombre TSDR (región desmetilada específica de Treg). Para verificar este hallazgo, los inventores analizaron el patrón de metilación de TSDR en otros 12 donantes (donantes n° 4-15).

35 Puesto que FOXP3 está ligado a X, se analizó por separado el ADN de donantes masculinos y femeninos. En la Figura 6A, se muestra la secuenciación de bisulfito de tres donantes, dos hombres, una mujer (donantes n° 4-6). Como se esperaba, la TSDR estaba completamente metilada en linfocitos T vírgenes de todos los donantes (Figura 6A). En Treg derivados de los dos donantes masculinos (n° 5 y 6), la TSDR estaba completamente desmetilada, mientras que los Treg derivados de la donante femenina (n° 4) presentaron hemimetilación. Como un enfoque paralelo, el estado de metilación de un motivo CpG sencillo dentro de la TSDR se ensayó por análisis de MS-SNuPE (extensión de cebador de nucleótidos sencillos sensible a metilación) en los donantes n° 4-15 (Figura 6B, Tabla 1). Este experimento confirmó los datos de secuenciación puesto que los inventores observaron una metilación casi completa del motivo CpG seleccionado con una señal de fondo baja para todas las muestras de linfocitos T CD25-CD45RA+CD4+ vírgenes. Por el contrario, este motivo siempre estaba desmetilado en muestras de Treg CD25altoCD45RA-CD4+ masculinas. La desmetilación relativa medida por MS-SNuPE correspondía al porcentaje de células FOXP3+ entre los Treg CD25altoCD45RA-CD4+ según se determinó por citometría de flujo (Tabla 1). En mujeres, la desmetilación en todos los donantes fue de aproximadamente el 50 % de la de los hombres, reflejando un número dado de células Foxp3+ el silenciamiento epigenético de un alelo del cromosoma X.

50 Hasta donde saben los inventores, este es el primer informe de regulación epigenética específica de tejido de un gen que está sujeto a inactivación de cromosoma X.

La expresión de FOXP3 transitoria en ausencia de funciones reguladoras se ha indicado recientemente para linfocitos T CD4+ convencionales activados (Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der Zanden, L de Vries RR, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Toes RE. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol.* 2005;66:13-20. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, Deroos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:6659-6664). Para determinar si se produciría desmetilación de la región conservada en la evolución del gen *FOXP3* en tales linfocitos T CD4+ que expresan FOXP3 de forma transitoria, los inventores estimularon linfocitos T CD25-CD45RA+CD4+ vírgenes clasificados por FACS en diversos puntos temporales seguido de análisis de citometría de flujo de la expresión de FOXP3 y análisis de MSSNuPE del estado de metilación del gen *FOXP3*.

La población de partida de linfocitos T CD25-CD45RA+CD4+ vírgenes clasificados por FACS en general contenía menos de 0,5 % de células FOXP3+. Sin embargo, tras la estimulación, las células no solamente regularon positivamente uniformemente tanto CD25 como FOXP3, sino que también expresaron niveles altos de FOXP3 (FOXP3^{alto}) en una fracción significativa de células (Figura 7, Tabla 2), confirmando datos recientemente publicados (Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der Zanden, L de Vries RR, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Toes RE. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. Hum Immunol. 2005;66:13-20. Mantel PY, Ouaked N, Ruckert B, Karagiannidis C, Welz R, Blaser K, Schmidt-Weber CB. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. J Immunol. 2006;176:3593-3602. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, Deroos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:6659-6664. Pillai V, Ortega SB, Wang CK, Karandikar NJ. Transient regulatory T-cells: A state attained by all activated human T-cells. Clin Immunol. 2006; Epub antes de impresión).

Cuando los inventores analizaron el estado de metilación del gen *FOXP3* en estos linfocitos T CD4+ activados por análisis de MS-SNuPE, observaron una metilación casi completa del motivo CpG seleccionado de la TSDR a pesar de alta expresión de FOXP3 (Figura 7 y Tabla 2). Incluso en el caso de un donante masculino representado en la Figura 3, en el que casi el 30 % de los linfocitos T CD4+ activados expresaron altos niveles de FOXP3, apenas fue detectable ninguna desmetilación (1,4 %) por análisis de MSSNuPE. Esto no se observó en linfocitos T CD4+ seleccionados por MACS, en los que una fracción de células del 10,4 % expresaba FOXP3, compuesta principalmente de Treg CD25^{alto}CD4+. A diferencia de los linfocitos T CD4+ que expresan FOXP3 de forma transitoria, estos Treg naturales se detectaron fácilmente por análisis de MS-SNuPE puesto que se midieron motivos CpG desmetilados 12,7 %. Por lo tanto, el análisis del estado de metilación del gen *FOXP3* permite diferenciar entre Treg FOXP3+CD25^{alto}CD4+ naturales y linfocitos T CD4+ no reguladores convencionales que expresan solamente de forma transitoria FOXP3 tras la activación.

El análisis de secuenciación de bisulfitos de regiones génicas representativas mostró diversas regiones metiladas diferencialmente incluyendo, pero sin limitación, la TSDR (región desmetilada específica de Treg). En lo que se refiere a la TSDR, los datos de Treg y linfocitos T vírgenes aislados de nuevo confirman los datos murinos previamente indicados, subrayando la destacada significación de esta región diferencialmente metilada.

La presente invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos sin limitarse a los mismos. En las Figuras y Secuencias adjuntas,

La Figura 1 muestra la estructura esquemática del locus murino *foxp3* con intrones, exones y secuencias reguladoras. Además, los amplicones se indican, junto con posiciones CpG como se muestra en la Figura 3.

La Figura 2 muestra células estimuladas en presencia de TGF- β que son Fxp3+. En (B), puede observarse una desmetilación.

La Figura 3 muestra el análisis de metilación de linfocitos purificados, en los que el linfocito T regulador (HUE2 en la Figura 3) muestra desmetilación fuerte, en particular en los amplicones 1 y 2 (todos los datos no agrupados). AMP566 = amplicón 2; AMP567 = amplicón 1; AMP568 = amplicón 4 y AMP569 = amplicón 3. Se indican posiciones particulares en el amplicón por el número que sigue al amplicón, es decir AMP566:38 es la posición 38 en el amplicón 2.

Las SEC ID N°: 1 a 8 muestran cebadores como se usan para los amplicones particulares 1 a 4 como se ha descrito en los ejemplos con respecto a datos murinos.

La Figura 4 muestra organización genética del gen *foxp3* humano en el Número de Acceso NC_000023.

La Figura 5 muestra desmetilación del gen *FOXP3* en Treg Fxp3+CD25^{alto}CD4+. A) linfocitos T CD4+ seleccionados por MACS aislados de sangre periférica se tiñeron con respecto CD25 y CD45RA y se clasificaron en Treg CD25^{alto}CD45RA- y linfocitos T vírgenes CD25-CD45RA+ por FACS. El análisis de citometría de flujo muestra tinción de células antes de clasificación por FACS (panel izquierdo) así como la pureza de clasificación y expresión de FOXP3 en linfocitos T vírgenes CD25-CD45RA+ clasificados y Treg CD25^{alto}CD45RA (paneles medio y derecho, respectivamente). Los números presentan la frecuencia de células dentro de poblaciones indicadas. Se representa la tinción de células de un donante representativo. B) Visión de conjunto esquemática del gen *FOXP3* y posicionamiento de los amplicones diseñados para análisis de metilación (panel superior) el panel inferior representa tasas de metilación de CpG fusionadas medidas por secuenciación de bisulfito de los donantes n° 1-3; cada caja representa la tasa de metilación de un CpG sencillo de acuerdo con el código de color (amarillo = 0 % de metilación, azul = 100 % de metilación).

La Figura 6 muestra el patrón de metilación de la región conservada en la evolución en Treg Fxp3+CD25^{alto}CD4+. El patrón de metilación del amplicón 5 (Amp 5) que abarca la TSDR de los donantes n° 4-6 (panel izquierdo). Se seleccionó un motivo CpG sencillo dentro de Amp5 (flecha roja) para análisis de MS-SNuPE, que se realizó en los mismos tres donantes (panel derecho). Los picos azules corresponden a una citosina metilada y los picos verdes corresponden a citosina no metilada. Los datos originales se muestran en el

electroferograma (eje X: tamaño del fragmento en bases; eje Y: intensidades de señal en unidades de luz relativas). Los números representan la frecuencia de citosinas no metiladas.

La Figura 7 muestra que la región conservada del gen *FOXP3* está completamente metilada en linfocitos T CD4⁺ convencionales activados. Los linfocitos T CD4⁺ del donante masculino n° 17 se clasificaron como linfocitos T CD25-CD45RA+CD4⁺ vírgenes por FACS y se estimularon *in vitro* durante 4 días. A) el análisis de citometría de flujo muestra tinción de linfocitos T CD4⁺ totales clasificados por MACS (panel izquierdo), linfocitos T CD25-CD45RA+CD4⁺ vírgenes clasificados por FACS (panel medio) y linfocitos T CD4⁺ vírgenes estimulados para CD25 y FOXP3. Los números indican la frecuencia de células FOXP3⁺ entre los linfocitos T CD4⁺ totales y linfocitos T CD4⁺ vírgenes clasificados con FACS (panel izquierdo y medio, respectivamente) así como células con FOXP3^{alto} entre linfocitos T CD4⁺ vírgenes estimulados (panel derecho). B) análisis de MS-SNuPE de un motivo CpG sencillo dentro de Amp5 en linfocitos T CD4⁺ (panel izquierdo), linfocitos T CD25-CD45RA+CD4⁺ vírgenes clasificados por FACS (panel medio) y linfocitos T CD4⁺ vírgenes estimulados. Los picos azules corresponden a una citosina metilada y los picos verdes corresponden a citosina no metilada. Los datos originales se muestran en el electroferograma (Eje X: tamaño del fragmento en bases; Eje Y: intensidad de señal en unidades de luz relativas). Los números presentan la frecuencia de citosinas no metiladas.

Las SEC ID N°: 9 a 31 muestran cebadores como se usan para los amplicones particulares 1 a 11 y el MS-SNuPE como se describe en los ejemplos con respecto a datos humanos.

Ejemplos

20 Ejemplo I: Datos obtenidos con ratones

Ratones

Se criaron ratones BALB/c en el BfR (Bundesinstitut fuer Risikobewertung, Berlín, Alemania) y se usaron a las 6-12 semanas de edad. Todos los experimentos animales se realizaron en condiciones específicas sin patógenos y de acuerdo con direcciones institucionales, estatales y federales.

25 Clasificación de células *ex vivo*

Se aislaron linfocitos T CD4⁺ de suspensiones de células sencillas de LN y bazo agrupadas usando microperlas multiselección anti FITC más anti CD4-FITC y el sistema de separación magnético AutoMACS (Miltenyi Biotec). Después de liberar las perlas de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se separaron las células CD25⁺ y CD25⁻ usando anti CD25-APC más microperlas anti APC. Se clasificaron las suspensiones celulares sencillas de timo con respecto a células CD8⁺ y CD8⁻ usando perlas anti CD8 y el sistema de separación magnético AutoMACS. Los timocitos CD8⁻ clasificados por MACS se tiñeron posteriormente usando anti CD4-FITC, anti CD25-APC y anti CD19-PE y se clasificaron en subconjuntos CD25⁺ y CD25⁻ de timocitos SP CD4 así como en timocitos DN CD19⁻ por FACS (Aria, BD Bioscience). Los timocitos CD8⁺ clasificados por MACS se tiñeron usando anti CD4-FITC y anti CD8-PerCP y se clasificaron en timocitos DP por FACS. Todos los subconjuntos se clasificaron a una pureza de más del 98 %.

Linfocitos T reguladores inducidos por TGF-β

Se aislaron linfocitos T CD4⁺ de suspensiones de células sencillas de LN y de bazo agrupadas usando microperlas multiselección anti FITC más anti CD4-FITC y el sistema de separación magnético AutoMACS (Miltenyi Biotec). Después de liberar las perlas de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se mermaron las células CD25⁺ usando microperlas anti CD25-APC más anti APC. Para evitar la expansión de linfocitos T reguladores Foxp3⁺ precomprometidos los inventores excluyeron la mayoría de los linfocitos T reguladores Foxp3⁺ residuales de la fracción de linfocitos CD25⁻CD4⁺ clasificando con respecto a células CD62L^{alto} usando microperlas anti CD62L. Los linfocitos T CD62L^{alto}CD25⁻CD4⁺ clasificados por MACS se estimularon durante 2 días usando anti CD3 (6 µg/ml) y anti CD28 (4 µg/ml) unido a placa. Para cultivos de Th1 se añadió anti-IL-4 5 µg/ml, IFN-γ 20 ng/ml (R&D systems) e IL-12 5 ng/ml (R&D systems) y para cultivos de TGF-β, TGFβ 5 ng/ml (Sigma) e IL-2 10 ng/ml (R&D systems) al cultivo. Después de 2 días se retiraron las células del estímulo, se transfirieron a placas no revestidas y se cultivaron durante otros tres días. Todos los cultivos celulares se realizaron con RPMI 1640 (Gibco) complementado con FCS 10 % (Sigma). El día 5, se tiñeron las células cultivadas usando antiCD25-APC y se clasificaron con respecto a células CD25⁺ por FACS (Aria).

50 Protocolo de análisis de metilación:

Centrándose en una región de 30,8 kb del locus *sf* (Brunkow ME y col (2001) Nat Gen. 27:68) que alberga el gen *foxp3*, se seleccionaron secuencias para análisis de metilación basándose en la densidad de CpG, en particular, se consideraron para diseño de amplicón regiones promotoras así como límites de exón e intrón. Tras la PCR, se diseñaron cebadores para producir cuatro amplicones: Los amplicones solapantes 1 y 2 se localizan cadena arriba del sitio de comienzo de la transcripción, los amplicones 3 y 4 se alinean con el 7° intrón de acuerdo con Brunow y col. (Brunkow ME y col (2001) Nat Gen. 27:68).

Se resumen los cebadores (dirección 5' a 3') para los cuatro amplicones y su localización genómica exacta de acuerdo con ENSEMBL (v36 Dic 05):

- Amp 566 (amplicón 2): X 5822854 a 5823308 (+)
 dir: ATTTGAATTGGATATGGTTTGT (SEC ID N° 1); inv:
- 5 AACCTTAAACCCCTCTAACATC (SEC ID N° 2);
 Amp567 (amplicón 1): X 5822584 a 5823048 (+)
 dir: AGGAAGAGAAGGGGGTAGATA (SEC ID N° 3); inv:
 AAATAACATTCCAAAACCAAC (SEC ID N° 4);
 AMP568 (amplicón 4): X 5829352 a 5829652 (+)
- 10 dir: TGGTTGTTTTGGAGTTTAGTGT (SEC ID N° 5); inv:
 CACTTTTCTACCTTCCACAAAT (SEC ID N° 6);
 Amp569 (amplicón 3): X 5828765 a 5829243 (+)
 dir: AGAGGTTGAAGGAGGAGTATTT (SEC ID N° 7); inv:
 ACTATCTATCCAATTCCCAAC (SEC ID N° 8).
- 15 Los cebadores se usaron tanto para amplificación por PCR de ADN genómico convertido por bisulfito como para reacciones de secuencia.

Se aisló ADN genómico de linfocitos purificados usando el kit de tejido DNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del proveedor.

- 20 Se realizó tratamiento con bisulfito sódico de ADN genómico de acuerdo con Olek y col. (Olek, A., Oswald, J., Walter, J. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24, 5064-5066) con modificaciones menores, dando como resultado la conversión de citosina no metilada a uracilo, mientras que las citosinas metiladas permanecían sin cambios. En una amplificación por PCR posterior el uracilo se reemplazó con timina. Por lo tanto, la detección de una "C" en las reacciones de secuenciación refleja metilación del ADN genómico en ese sitio. La detección de una "T" en el mismo sitio en su lugar, refleja la ausencia de una modificación de metilo de la citosina genómica.
- 25 Se realizaron PCR en termocicladores MJ Research (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) en un volumen final de 25 µl que contenía tampón de PCR 1x, ADN *Taq* polimerasa 1 U (Qiagen, Hilden, Alemania), dNTP 200 µM, 12,5 pmol de cada uno de los cebadores inverso y directo y 7 ng de ADN genómico tratado con bisulfito. Las condiciones de amplificación fueron 95 °C durante 15 minutos y 40 ciclos de 95 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 1 min y una etapa de extensión final de 10 minutos a 72 °C. Los productos de PCR se purificaron usando ExoSAP-IT (USB Corp., Cleveland, Ohio, Estados Unidos) y se secuenciaron aplicando el cebador o
- 30 cebadores de PCR y la química de secuenciación de ciclo ABI Big Die Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos) seguido de electroforesis capilar en un analizador genético ABI 3100. Los archivos de seguimiento se interpretaron usando ESME, que normaliza los rastros de secuencia, corrige la conversión de bisulfito incompleta y permite la cuantificación de señales de metilación (Lewin, J., Schmitt, A.O., Adorjan, P., Hildmann, T., Piepenbrock, C. (2004) *Bioinformatics.* 20, 3005-3012).
- 35

Ejemplo II: Datos obtenidos con seres humanos

Preparación de células y citometría de flujo

- Se obtuvieron capas leucocíticas con la aprobación del comité de ética local (DRK Blutspendedienst, Berlín, Alemania). Las PBMC se separaron con un gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich). La pureza de la población clasificada fue del 95-99 %, según se determinó por FACScalibur™ usando software CELLQuest™ (BDBiosciences).
- 40 Se aislaron linfocitos T CD4+ de PBMC usando microperlas anti CD4 y el sistema de separación magnético AutoMACS (Miltenyi Biotec). Los linfocitos T CD4+ clasificados por MACS se tiñeron usando anti-CD45RA-FITC y anti-CD25-APC (MA-251, BD-PharMingen). Las células se clasificaron en Treg CD25^{alto}CD45RA⁻ y linfocitos T vírgenes CD25-CD45RA⁺ por FACS (Aria, BD-Bioscience). Se realizó tinción de FOXP3 con el conjunto de tinción anti FOXP3 humana PE (eBioscience). Se realizó análisis citométrico en un LSRII (BD-Biosciences) usando el software CellQuest™.
- 45

Estimulación *in vitro* de linfocitos T CD4+ vírgenes

Se estimularon linfocitos T CD4+ vírgenes clasificados por FACS (CD25-CD45RA⁺) de tres a siete días usando perlas revestidas con antiCD3/antiCD28 (Dyna) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó un cultivo

celular en medio RPMI (Gibco) complementado con FCS 10 % (Sigma). En los puntos temporales indicados, se recolectaron células estimuladas y se tomaron alícuotas tanto para el análisis de expresión de FOXP3 por citometría de flujo como para el análisis del estado de metilación del gen *FOXP3*.

Preparación de ADN, conversión de bisulfitos, PCR y secuenciación

- 5 Se aisló ADN genómico usando el kit de tejido DNeasy (Qiagen) siguiendo el protocolo para células animales cultivadas. Se realizó tratamiento con bisulfito de ADN genómico como se ha descrito previamente (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis *Nucleic Acids Res.* 2007;24:5064-5066.). Se realizó PCR en un volumen final de 25 µl que contenía tampón de PCR 1x, ADN *Taq* polimerasa 1 U (Qiagen), dNTP 200 µM, 12,5 pmol de cada uno de los cebadores inverso y directo y 7 ng de ADN
- 10 genómico tratado con bisulfito a 95 °C durante 15 minutos y 40 ciclos de 95 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 1 minuto y una etapa de extensión final de 10 minutos a 72 °C. Los productos de PCR se purificaron usando ExoSAP-IT (USB Corp.) y se secuenciaron aplicando los cebadores de PCR y química de ABI Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems) seguido de electroforesis capilar en un analizador genético ABI 3100. Los
- 15 archivos de AB1 se interpretaron usando ESME (Lewin J, Schmitt AO, Adorjan P, Hildmann T, Piepenbrock C. Quantitative DNA methylation analysis based on four-dye trace data from direct sequencing of PCR amplicates. *Bioinformatics.* 2004;20:3005-3012.).

Oligonucleótidos

- Se proporcionan las secuencias en dirección 5' a 3'. Se usaron cebadores para reacciones de secuencia y PCR específicas de bisulfitos. Especificidad de cadena y orientación: Los cebadores "p" y "o" producen amplicones basándose en la hebra +1, "r" y "q" en la hebra -1. Los cebadores "p" y "q" indican orientación directa, los cebadores "o" y "r" indican inversa.
- 20

Amplificado	Secuencia	Secuencia
Amp1	p-GTTATTTGGAGTTTATGGG (SEC ID N° 9)	o-CCCCACTACTTACCTCTCTACA (SEC ID N° 10)
Amp2	r-AAAACCCTCCTATCTACCTCC (SEC ID N° 11)	q-AGGGTATGTGTTGGTTATTGT (SEC ID N° 12)
Amp3	r-AAACCTCACTTCTTAATCCCTA (SEC ID N° 13)	q-TTGGGATGGTTTTAAGTGTTAT (SEC ID N° 14)
Amp4	r- AACCTCAAAACCTAACTCATA (SEC ID N° 15)	q- GGAGGTGATAGTAAAGAAAGGA (SEC ID N° 16)
Amp5	p-TGTTGGGGTAGAGGATTT (SEC ID N° 17)	o-TATCACCCACCTAAACCAA (SEC ID N° 18)
Amp6	r- AAATCCTAAAACTCAAAACCA (SEC ID N° 19)	q-GGTGATGATGGAGGTATGTTA (SEC ID N° 20)
Amp7	p-TAGAGATGGTAATAGGGG AG (SEC ID N° 21)	o-CCAACCTCACAAAAACTAAACT (SEC ID N° 22)
Amp8	p-GTGAGGTTGGTTTTATATTGT (SEC ID N° 23)	o-TATCCCTATCTCAACCAATC (SEC ID N° 24)
Amp9	r- TCCTAATTCACACACCAAATA (SEC ID N° 25)	q- AAGGTTAAAAGGAGATTAAGAGG (SEC ID N° 26)
Amp10	r-AAATTTACCTAATCCCCACATT (SEC ID N° 27)	q-GGTTGTTGGTTTAGAAAAGTGT (SEC ID N° 28)
Amp11	p- AGGAGTAGGAGATTTTATTTGG (SEC ID N° 29)	o-TTCAACTACCTAACCTCAACCT (SEC ID N° 30)

MS-SNuPE

5 Se realizó MS-SNuPE usando el kit ABIPrism-Snapshot (Applied Biosystems). Los sustratos fueron productos de PCR producidos a partir de ADN genómico convertido con bisulfito usando cebadores Amp5 "p" y "o". El ensayo utiliza un cebador o cebadores de extensión interna e hibridan inmediatamente 5' del nucleótido relevante. En presencia de ddNTP marcados, el cebador se extiende por un nucleótido sencillo. Se realizó análisis de electroforesis capilar usando analizador genético ABI 3100 y software GeneMapper (v3.5). Cebadores de extensión: FOXP3: CCCAACAAACAATACAAAAAACC (SEC ID N°: 31)

Tabla 1: La desmetilación del gen FOXP3 en Treg CD25^{alto}CD4⁺ corresponde a frecuencia de células FOXP3⁺.

Donante	MS-SNuPE	FACS	Género
	[% no metilado]	[% de células FOXP3 ⁺]	
4	32,7	71,3	F
5	100,0	95,1	M
6	88,6	89,9	M
7	84,3	84,9	M
8	100,0	88,7	M
9	93,6	82,9	M
10	84,3	92,0	M
11	45,7	95,6	F
12	38,4	79,6	F
13	33,9	85,9	F
14	50,0	76,9	F
15	88,0	94,6	M

10 Sumario de MS-SNuPE y análisis de citometría de flujo de Treg CD25^{alto}CD45RA clasificados por FACS de doce donantes (n° 4-15). Se realizó análisis de MS-SNuPE como se describe en la Figura 6. Se representan las frecuencias de citosinas no metiladas y frecuencias de células FOXP3⁺ dentro de Treg CD25^{alto}CD45RA- de donantes masculinos (M) y femeninos (F).

Tabla 2: Gen FOXP3 metilado en linfocitos T FOXP3⁺CD4⁺ convencionales activados.

Donante	Duración del cultivo	MS-SNuPE	FACS	Género
	[días]	[% no metilado]	[% de células con FOXP3 ^{alto}]	
16	3	1,6	12,4	F
17	3	1,6	14,5	M
17	4	1,4	29,7	M
18	3	1,5	14,2	M
19	3	3,9	12,8	M
20	4	1,7	39,3	F
20	7	3,9	32,5	F

15 Sumario de MS-SNuPE y análisis de citometría de flujo de linfocitos T CD4⁺ vírgenes estimulados *in vitro* de cinco donantes. Las células se estimularon para diversos puntos temporales. Se realizó análisis de MS-SNuPE esencialmente como se describe en la Figura 3. Se representan las frecuencias de citosinas no metiladas y frecuencias de células FOXP3^{alto} dentro de linfocitos T estimulados de donantes masculinos (M) y femeninos (F).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Charité - Universitätsmedizin Berlin Epiontis GmbH

<120> Detección y control de calidad de linfocitos T reguladores a través del análisis de metilación de ADN del gen FoxP3

- 5 <130> FB18387
 <150> US 60/777.631
 <151> 28-02-2006
 <160> 31
 <170> PatentIn version 3.3
- 10 <210> 1
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 1
- 15 attgaattg gatatggtt gt 22
 <210> 2
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
- 20 <400> 2
 aacctaaac cccttaaca tc 22
 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
- 25 <213> Mus musculus
 <400> 3
 aggaagagaa ggggtagat a 21
 <210> 4
 <211> 22
- 30 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 4
 aaactaacat tcaaaacca ac 22
 <210> 5
- 35 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 5
 tgggtgtttt ggagtttagt gt 22
 <210> 6
 <211> 22
 5 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 6
 cacttttcta cctccacaa at 22
 <210> 7
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 7
 agaggttgaa ggaggagtat tt 22
 15 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 8
 20 actatctatc caattcccca ac 22
 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 9
 gttatttggt gagttttatg gg 22
 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 ccccactact taccttctca ca 22
 <210> 11
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

aaaaccctcc tatctacctc c 21
 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 agggatgtg ttgggtatt gt 22
 <210> 13
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 aaacctcact tctaatccc ta 22
 <210> 14
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 ttggatggt ttaagtgt at 22
 20 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 25 aacctcaaa cctaactcat ac 22
 <210> 16
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 16
 ggagtgata gtaaagaaag ga 22
 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 tgttggggg tagaggattt 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 18
 tatcacccca cctaaaccaa 20
 <210> 19
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 aaatcctaaa atctcaaac ca 22
 <210> 20
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 ggtgatgatg gaggtatgtt a 21
 <210> 21
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 tagagatggt aataggggga g 21
 <210> 22
 25 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 ccaacctcac aaaaactaaa ct 22
 30 <210> 23
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 35 gtgaggttgg gttttatatt gt 22
 <210> 24
 <211> 22

<212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 tatccctatc tctcaaccaa tc 22
 5 <210> 25
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 10 tcctaattca cacaccaaaa ta 22
 <210> 26
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 26
 aaggttaaaa ggagattaag agg 23
 <210> 27
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 aatcttacct aatccccaca tt 22
 <210> 28
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 ggttggtgtg ttagaaagtg tt 22
 <210> 29
 30 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 aggagtagga gattttattt tgg 23
 35 <210> 30
 <211> 22
 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 30

ttcaactacc taacctcaac ct 22

<210> 31

5 <211> 23

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 31

ccaacaac aatacaaaaa acc 23

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar linfocitos T reguladores CD25⁺CD4⁺ estables positivos para FoxP3 de un mamífero en una muestra obtenida de dicho mamífero, que comprende
 - 5 analizar el estado de metilación de al menos una posición CpG en la región 5' cadena arriba del comienzo de transcripción, la región 5' no traducida, región promotora, intrones y/o límites exón/intrón del gen *foxp3* o un gen ortólogo o parálogo del mismo,
 - en el que la hipometilación es indicativa de un linfocito T regulador CD25⁺CD4⁺ estable positivo para FoxP3.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho análisis del estado de metilación comprende
 - 10 amplificación con al menos uno de los pares de cebadores seleccionados de SEC ID N° 1 y 2; SEC ID N° 3 y 4; SEC ID N° 5 y 6; SEC ID N° 7 y 8, SEC ID N° 9 y 10; SEC ID N° 11 y 12; SEC ID N° 13 y 14; SEC ID N° 15 y 16; SEC ID N° 17 y 18; SEC ID N° 19 y 20; SEC ID N° 21 y 22; SEC ID N° 23 y 24; SEC ID N° 25 y 26; SEC ID N° 27 y 28; SEC ID N° 29 y 30 y pares de cebadores ortólogos o parálogos de los mismos.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho análisis del estado de metilación comprende
 - 15 amplificación con al menos uno de los pares de cebadores seleccionados de SEC ID N° 1 y 2; SEC ID N° 3 y 4; SEC ID N° 15 y 16; SEC ID N° 17 y 18, SEC ID N° 19 y 20; SEC ID N° 21 y 22; SEC ID N° 23 y 24; SEC ID N° 29 y 30 y pares de cebadores ortólogos o parálogos de los mismos, preferentemente SEC ID N° 17 y 18 y pares de cebadores ortólogos o parálogos del mismo.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que dicho análisis del estado de metilación
 - 20 comprende analizar el estado de metilación de al menos una posición CpG seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 38, 74, 90, 124, 151, 156, 205, 224, 228, 236, 298 y 368 del amplicón como se amplificó por el par de cebadores SEC ID N°: 1 y 2, las posiciones 158, 180, 308, 344, 360, 394, 421 y 426 del amplicón como se amplificó por el par de cebadores SEC ID N°: 3 y 4, las posiciones 37, 69, 311, 315, 319, 338 y 371 del amplicón como se amplificó por el par de cebadores SEC ID N°: 5 y 6, las posiciones 93, 170, 173, 176 y 281 del amplicón como se amplificó por el par de cebadores SEC ID N°: 7 y 8 y posiciones CpG ortólogas o parálogas de las mismas.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho análisis del estado de metilación
 - 25 comprende analizar el estado de metilación de al menos una posición CpG seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 38, 74, 90, 124, 156, 205, 224, 236, 298 y 368 del amplicón como se amplificó por el par de cebadores SEC ID N°: 1 y 2, posiciones 180, 308, 344 y 394 del amplicón como se amplificó por el par de cebadores SEC ID N°: 3 y 4 y posiciones CpG ortólogas o parálogas de las mismas.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho análisis del estado de
 - 30 metilación comprende un procedimiento seleccionado de digestiones enzimáticas específicas de metilación, secuenciación por bisulfito, MSP, HeavyMethyl, MethyLight, Ms-SNuPE u otros procedimientos que se basan en una detección de ADN amplificado.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho mamífero es un ratón,
 - 35 rata, mono o ser humano.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende adicionalmente una
 - inducción con TGF-β.
9. Un procedimiento *in vitro* para identificar sustancias químicas y/o biológicas que modulan la expresión de *foxp3* en
 - 40 un linfocito T, que comprende poner en contacto una o más de dichas sustancias químicas y/o biológicas con un linfocito T, realizar el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y detectar si dicha sustancia química y/o biológica modula la metilación de las posiciones CpG como se ha analizado.
10. El procedimiento para identificar sustancias químicas y/o biológicas de acuerdo con la reivindicación 9, en el que
 - dicha sustancia proporciona una desmetilación de las posiciones CpG como se ha analizado en al menos 80 %, preferentemente 90 % y más preferentemente 95 %.
11. Un kit para identificar linfocitos T reguladores basándose en el análisis del estado de metilación de las posiciones
 - 45 CpG en el gen *foxp3*, que comprende un reactivo de bisulfito, protocolos de procedimiento y sondas oligonucleotídicas para el análisis de metilación de las posiciones CpG seleccionadas de las posiciones que consisten en las posiciones 38, 74, 90, 124, 156, 205, 224, 236, 298 y 368 del amplicón como se amplificó por el par de cebadores SEC ID N°: 1 y 2, las posiciones 180, 308, 344 y 394 del amplicón como se amplificó por el par de
 - 50 cebadores SEC ID N°: 3 y 4 y posiciones CpG ortólogas y parálogas de las mismas.
12. Uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 11 para detectar y/o identificar linfocitos T reguladores
 - CD25⁺CD4⁺ estables positivos para FoxP3.

Figura 1

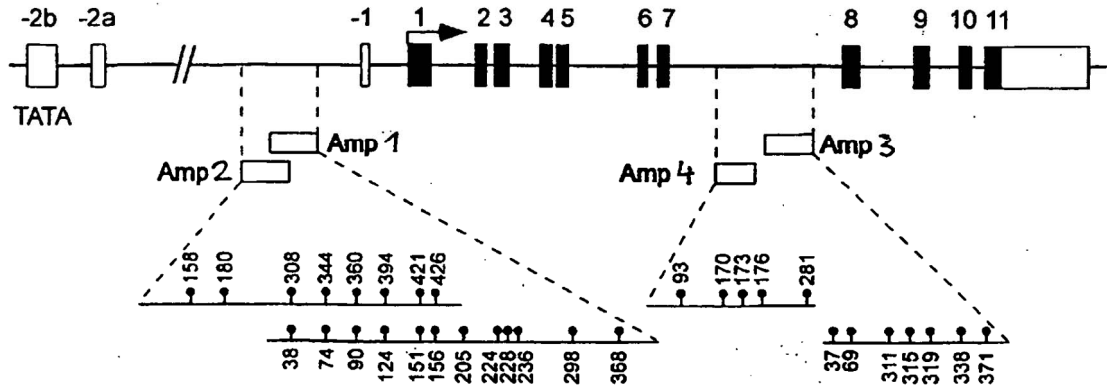


Figura 2

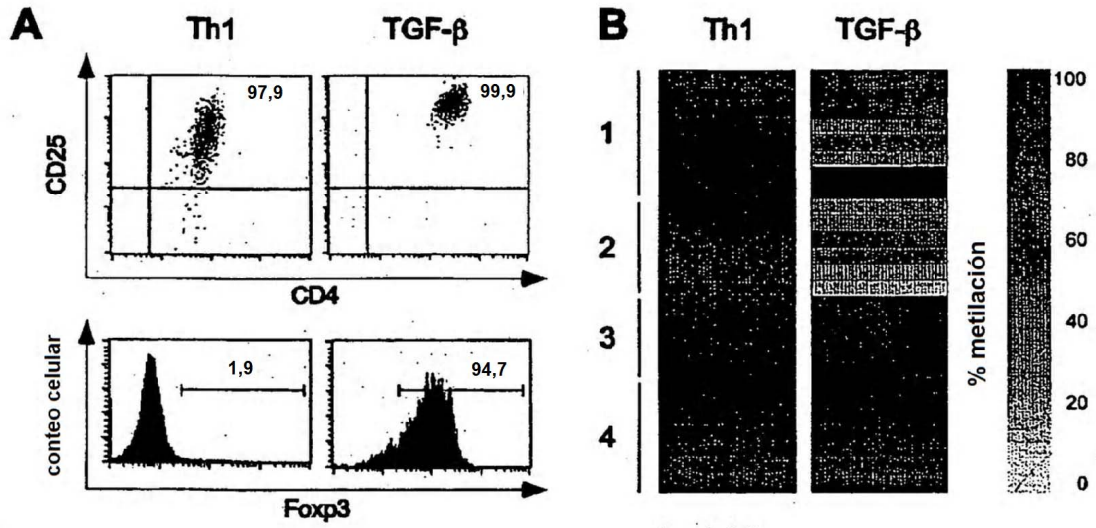


Figura 3

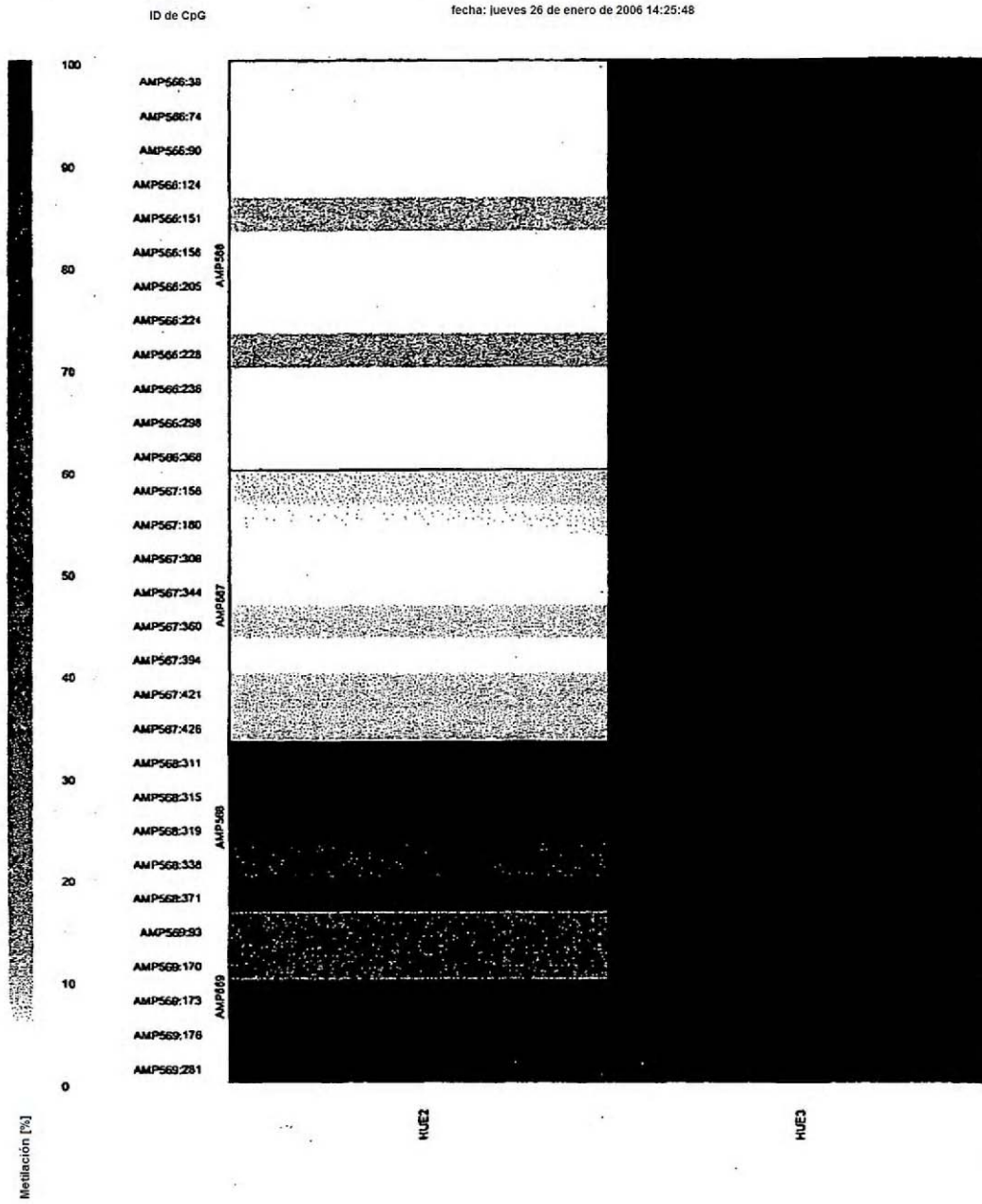


Figura 4

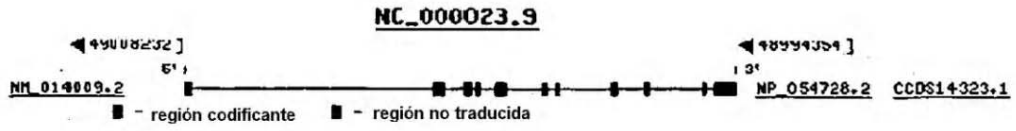


Figura 5

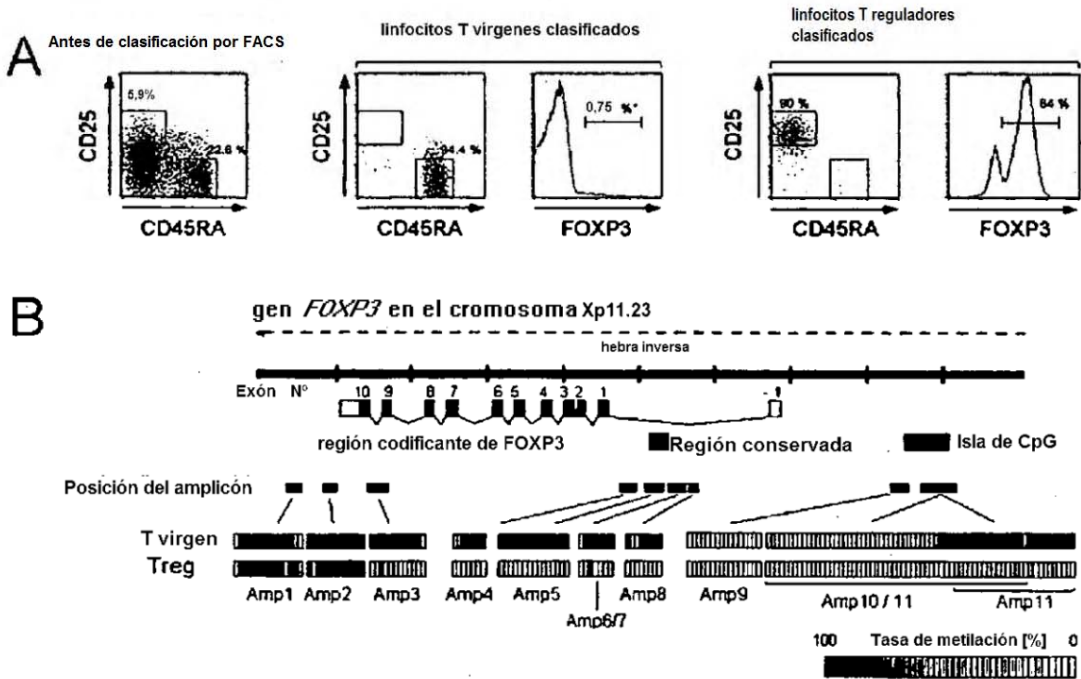


Figura 6

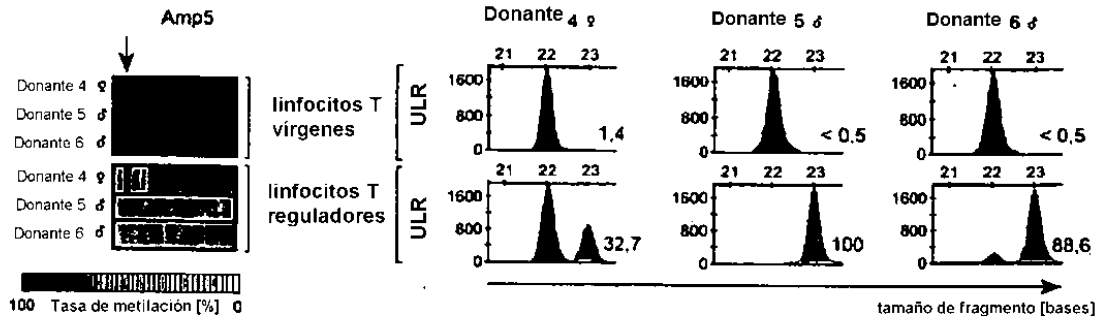


Figura 7

