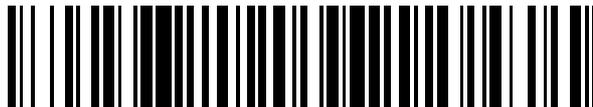


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 506**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2013 PCT/EP2013/053009**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO2013135454**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2013 E 13703845 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2788510**

54 Título: **Marcador epigenético para la identificación de linfocitos T CD3CD4 positivos**

30 Prioridad:

**12.03.2012 US 201261609580 P**

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

**21.06.2017**

73 Titular/es:

**EPIONTIS GMBH (100.0%)  
Rudower Chaussee 29  
12489 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**OLEK, SVEN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 618 506 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

Marcador epigenético para la identificación de linfocitos T CD3CD4 positivos

La presente invención se refiere a un procedimiento, en particular, a un procedimiento *in vitro*, para identificar linfocitos T CD3CD4 positivos de un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento el análisis de la convertibilidad por bisulfito de al menos una posición CpG en la región convertible por bisulfito no metilada específica de linfocito T auxiliar CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, siendo una convertibilidad por bisulfito de al menos una posición CpG en al menos un 90%, preferiblemente, al menos un 91% y más preferiblemente al menos un 92%, sobre todo preferiblemente al menos un 95%, en dicha muestra, indicativa de célula linfocito T CD4<sup>+</sup>, en particular una célula linfocito T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, estando presente dicha al menos una posición CpG en un amplicón seleccionado del grupo que consiste en No. 1255 de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, No. 1999 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, No. 2000 de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 y No. 2001 de acuerdo con la SEQ ID NO: 5.

Uno de los objetivos de la presente invención consiste en proporcionar un nuevo medio más robusto para detectar cuantitativamente y medir subgrupos concretos de linfocitos T de la sangre dentro de cualquier órgano sólido o tejido o cualquier fluido sanguíneo de un mamífero. Al emplear este procedimiento, los autores de la invención proporcionan un nuevo medio no conocido anteriormente de determinación, cuantificación y medición rutinaria de linfocitos T CD4.

**Antecedentes de la invención**

Los linfocitos T constituyen un principal componente del sistema inmune de los mamíferos. Los linfocitos T tanto CD4 como CD8 son responsables del funcionamiento apropiado de dicho sistema inmune. Mientras que los linfocitos T CD8 median en la defensa inmune citotóxica, las células CD4, los denominados linfocitos T auxiliares, asisten tanto en la defensa humoral como en la defensa inmune mediada por célula.

CD4 (cúmulo de diferenciación 4) es una glucoproteína expresada en la superficie de linfocitos T auxiliares, monocitos, macrófagos y células dendríticas. En los seres humanos, la proteína CD4 está codificada por el gen CD4.

A pesar de que casi todas las células de un individuo contienen exactamente el mismo complemento de código de ADN, los organismos superiores deben imponer y mantener diferentes patrones de expresión genética en diversos tipos de tejido. La mayor parte de la regulación genética es transitoria, dependiendo del estado en curso de la célula y los cambios en los estímulos externos. La regulación persistente, por una parte, es una de las principales funciones de la epigenética – patrones reguladores hereditarios que no alteran el código genético básico del ADN. La metilación de ADN es la forma arquetípica de regulación epigenética; sirve como memoria estable para las células y desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la identidad a largo plazo de varios tipos de células. Recientemente, se han descubierto otras formas de regulación epigenética. Además de la “Quinta base” 5-metilcitosina (mC), se pueden encontrar una sexta (5-hidroximetilcitosina, hmC), una séptima (5-formilcitosina, fC) y una octava (5-carboxicitosina, cC) (Michael J. Booth et al. Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution *Science* 18 de mayo de 2012, vol. 336 no. 6083 pp. 934-937).

Por tanto, a fin de establecer las definiciones para la presente solicitud, modificaciones epigenéticas en la secuencia de ADN se refiere según la terminología a (i) citosina no convertible por bisulfito (incluyendo 5-metilcitosina (mC), 5-hidroximetilcitosina (hmC) y (ii) citosina convertible por bisulfito (5-formilcitosina (fC) y/o 5-carboxicitosina (cC)). Dado que ambos tipos de metilación, mC y hmC, no son convertibles con bisulfito, no es posible distinguir entre las dos. Igualmente, fC, cC, así como la citosina no modificada son convertibles con bisulfito y tampoco pueden distinguirse entre sí. La expresión ADN metilado abarca mC y hmC. La expresión ADN no metilado abarca fC, cC y ADN no modificado.

Se espera asimismo que en el futuro se descubran nuevas variantes de modificaciones de ADN. Cada tipo de modificación será convertible con bisulfito o no. No obstante, dado que el presente procedimiento distingue de forma fiable entre los dos grupos, estas nuevas modificaciones se podrán usar también para el procedimiento según la presente invención.

La diana primaria de las modificaciones de ADN mencionadas es la secuencia de dos nucleótidos Citosina-Guanina (un “sitio CpG”); dentro de este contexto, citosina (C) puede experimentar una modificación química simple para formilarse, metilarse, hidroximetilarse o carboxilarse. En el genoma humano, la secuencia CG es mucho más rara de lo esperado, excepto en ciertos cúmulos relativamente densos denominados “islas CpG”. Las islas CpG están frecuentemente asociadas con promotores génicos y se ha estimado que más de la mitad de los genes humanos tienen islas CpG (Antequera and Bird, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90: 11995-9, 1993).

La metilación aberrante del ADN está asociada frecuentemente con la transformación de células sanas a cancerosas. Entre los efectos observados se incluyen hipometilación de todo el genoma, aumento de la metilación de genes supresores de tumor e hipometilación de muchos oncogenes (revisado por ejemplo por Jones and Laird, *Nature Genetics* 21: 163-167, 1999; Esteller, *Oncogene* 21:5427-5440, 2002; y Laird, *Nature Reviews/Cancer* 3:253-266, 2003). Se ha reconocido que los perfiles de metilación son específicos de tumor (es decir, los cambios en el patrón de metilación de genes concretos o incluso CpGs individuales son diagnóstico de tipos de tumor concretos)

y existe en la actualidad una extensa colección de marcadores de diagnóstico para cánceres de vejiga, mama, colon, esófago, estómago, hígado, pulmón y próstata (resumido por ejemplo por Laird, Nature Reviews/Cancer 3:253-266, 2003).

5 Para una de las modificaciones de citosina descrita recientemente, 5-hidroximetilación, se ha demostrado la utilidad de la secuenciación con bisulfito oxidativo para cartografiar y cuantificar 5hmC en islas CpG. (Michael J. Booth y col. Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution Science 18 de mayo de 2012, vol. 336 no. 6083 pp 934-937). Se encontraron altos niveles de 5hmC en islas CpG asociadas con reguladores transcripcionales y elementos nucleares dispersos largos. Se sugiere que estas regiones podrían experimentar una reprogramación epigenética en células madre embrionarias.

10 El documento EP 1 213 360 describe un procedimiento de identificación de una célula, tejido o núcleo, que comprende la recogida de información sobre un patrón de metilación de ADN aislado de la célula, tejido o núcleo, y el análisis de la información resultante.

15 El documento WO 2004/050706 describe un subgrupo de linfocitos T y se refiere a características de linfocitos T reguladores que los definen como tales. Dicha solicitud también describe los usos de dichos linfocitos T, composiciones que los comprenden y quimiocinas que los reclutan en la modulación de una respuesta inmune.

El documento EP 2 199 411 describe un procedimiento, en particular un procedimiento *in vitro*, para identificar linfocitos T CD3<sup>+</sup> mediante el análisis de la convertibilidad con bisulfito de al menos una posición CpG dentro del gen CD3.

20 ZOU Y RETAL "Epigenetic silencing of CD4 in T cells committed to the cytotoxic lineage" NATURE GENETICS NOV 2001 (200111), vol. 29, no. 3.332-336 describe la identificación de sitios de metilación en el gen para CD4. TUTT LANDOLFIMMETAL, "Specific dimethylation of the CD4 gene during CD4 T lymphocyte differentiation" MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 34, no. 1,53-61 también describe la identificación de sitios de metilación en el primer intrón del gen para CD4.

25 El documento WO 2006/094836 y BARON UDO Y COL., "DNA Methylation analysis as a tool for cell typing" EPIGENETICS 2006 vol. no. 1, 55-60 describe la identificación de sitios de metilación en el gen para CD4 para tipificación celular.

30 Finalmente, el documento EP 1 826 279 describe un procedimiento, en particular un procedimiento *in vitro*, para identificar linfocitos T reguladores FOXP3 positivos, preferiblemente linfocitos T reguladores CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> de un mamífero que comprende el análisis del estado de metilación de al menos una posición CpG en el gen FOXP3 o un gen ortólogo o parálogo del mismo, y el uso de análisis de metilación de ADN del gen del factor de transcripción FOXP3 para detección, garantía y control de calidad de linfocitos T reguladores.

35 Tal como se ha mencionado anteriormente, recientemente se han descubierto tres nuevas modificaciones de citosina. Por consiguiente, es de esperar que los futuros hallazgos científicos corrijan e invaliden los patrones epigenéticos de modificación descritos en el pasado. Dichos patrones de modificación de citosina del pasado abarcan citosina convertible por bisulfito (no metilada, no modificada) y no convertible por bisulfito (metilada, modificada). Ambas expresiones han de ser redefinidas y corregidas dado que de acuerdo con los nuevos hallazgos científicos (i) citosina no convertible por bisulfito abarca 5-metilcitosina (mC) y 5-hidroximetilcitosina (hmC) y (ii) citosina convertible por bisulfito abarca 5-formilcitosina (fC), 5-carboxicitosina (cC) así como citosina no modificada.

40 Adicionalmente, las invenciones del pasado se basan en (i) la relación entre citosina convertible por bisulfito y la cantidad total de cromatina (locus de ADN convertible por bisulfito al 100%, independiente del tipo de célula,) o (ii) en la relación entre la citosina convertible por bisulfito (fC, cC, citosina no modificada) y la citosina no convertible por bisulfito (hmC y mC). Estas relaciones caracterizan el tipo de célula, la diferenciación celular, el estadio celular, así como los estadios celulares patológicos. Por lo tanto, las nuevas técnicas tendrán como resultado relaciones nuevas más específicas y podrían suplementar patrones específicos de célula en curso, específicos de estado celular, así como patológicos de modificaciones epigenéticas y, por lo tanto, definir nuevos potenciales biomarcadores. Las nuevas relaciones que se han de descubrir como biomarcadores se pueden definir como:

**Relación de biomarcador = a/b**

$$a = \sum (C \text{ y/o } mC \text{ y/o } hmC \text{ y/o } fC \text{ y/o } cC)$$

$$b = \sum (C \text{ y/o } mC \text{ y/o } hmC \text{ y/o } fC \text{ y/o } cC)$$

50 en las que a y b difieren entre sí por de uno a cuatro tipos de modificaciones. El descubrimiento de nuevas modificaciones de ADN alargará esta numeración.

55 A fin de establecer las definiciones para la presente solicitud, "modificaciones epigenéticas" en la secuencia de ADN se refiere según la terminología a (i) citosina convertible por bisulfito (5-formilcitosina, (fC) y/o 5-carboxicitosina (cC)) y (ii) citosina no convertible por bisulfito (que incluye 5-metilcitosina (mC), 5-hidroximetilcitosina, (hmC). Dado que ambos tipos de metilación, mC y hmC, no son convertibles por bisulfito, no es posible distinguir entre las dos. Igualmente, fC, cC así como citosina no modificada son convertibles por bisulfito y tampoco se pueden distinguir

entre sí. La expresión ADN "metilado" abarca mC así como hmC. La expresión "ADN no metilado" abarca fC, cC y ADN no modificado. Es de esperar que se descubran nuevas variantes de modificaciones de ADN en el futuro. Cada tipo de modificación será convertible o no por bisulfito. No obstante, dado que el presente procedimiento distingue de forma fiable entre los dos grupos, dichas nuevas modificaciones también se podrán usar como marcadores.

5 Asimismo, aparte de las modificaciones de ADN, también las histonas experimentan modificaciones postraduccionales que alteran su interacción con ADN y proteínas nucleares. Las modificaciones incluyen metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, citrulinación y ADP-ribosilación. El núcleo de las histonas H2A, H2B y H3 también puede modificarse. Las modificaciones de histona actúan en diversos procesos biológicos, tales como regulación genética, reparación de ADN, condensación de cromosomas (mitosis) y espermatogénesis (meiosis). También para estas modificaciones, es específico un patrón de modificación específico para diferentes tipos de células, estadios celulares, estado de diferenciación y dicho patrón se puede analizar en cuanto a la convertibilidad con bisulfito o procedimientos similares con el fin de identificar determinadas células o estadios celulares. La presente invención abarca también el uso de dichas modificaciones,

10 Si bien la medida y determinación de células CD4 es fácil por lo general y se consigue normalmente a través del análisis de la expresión de dichos antígenos sobre la superficie celular, clínicamente, sigue siendo un reto detectar específicamente, identificar, discriminar y cuantificar linfocitos T CD4<sup>+</sup>, ya que la expresión no es solo específica para linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Por lo tanto, la detección de linfocitos T auxiliares CD4<sup>+</sup>, aunque deseable, es problemática, en particular para aplicaciones de rutina.

15 En vista de lo anterior, un objeto de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento mejorado y robusto en particular basado en el análisis de la convertibilidad por bisulfito de citosina como herramienta superior con el fin de detectar, identificar, discriminar y cuantificar linfocitos T CD4<sup>+</sup> de forma más conveniente y fiable.

20 La presente invención resuelve el objeto mencionado proporcionando un procedimiento para identificar linfocitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> en un mamífero, en particular, en una muestra derivada de un mamífero, que comprende el análisis de la convertibilidad por bisulfito de al menos una posición CpG en la región convertible por bisulfito no metilada específica de linfocito T auxiliar CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, siendo una convertibilidad por bisulfito de al menos una posición CpG en al menos un 90%, preferiblemente, al menos un 91% y más preferiblemente al menos un 92%, sobre todo preferiblemente al menos un 95%, en dicha muestra, indicativa de célula linfocito T CD4<sup>+</sup>, en particular una célula linfocito T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, estando presente dicha al menos una posición CpG en un amplicón seleccionado del grupo que consiste en amplicón No. 1255 de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, No. 1999 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, No. 2000 de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 y No. 2001 de acuerdo con la SEQ ID NO: 5.

25 La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo por parte de los autores de la invención de que la identificación de una región del gen CD4 como marcador específico epigenético puede facilitar en gran medida la aplicación clínica de rutina del análisis de los marcadores mencionados. En el contexto de la presente invención, esta región genómica (véase SEQ ID NO: 1) se designa región convertible por bisulfito no metilada específica de linfocito T auxiliar CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. Sorprendentemente, el patrón discriminatorio de citosina convertible y no convertible por bisulfito se limita exclusivamente a los amplicones No. 1255 y Nos. 1999 a 2001. Consecuentemente, los amplicones (AMPs) localizados directamente fuera de la región, tanto en el extremo 5' (AMPs N° 32, 33, 1980) como en el extremo 3' (AMPs No. 1981, 1982) no presentan el patrón de modificación de citosina discriminatorio. Por lo tanto, los autores de la invención han identificado regiones AMPs moduladas por citosina específicas de linfocito T altamente CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> No. 1255 y 1999 a 2001. En el contexto de la presente invención, "convertibilidad por bisulfito" incluye tanto el análisis de modificaciones de citosina individuales como de varias con el fin de detectar una base de citosina ("C") que haya sido metilada (y/o modificada de otra forma tal como se describe en el presente documento) en la secuencia genómica original, frente a una base de timidina ("T") en lugar de una citosina que no haya sido metilada (y/o modificada de otra forma, tal como se describe en el presente documento) en la secuencia original, y por lo tanto, en un modo de realización preferido haya sido convertida por bisulfito.

30 En contraste con FACS y las medidas de ARNm, se pueden realizar las correspondientes mediciones independientemente de la purificación, almacenamiento y también, en cierto grado, la calidad del tejido.

35 En otro modo de realización preferido del procedimiento según la presente invención, dicha al menos una posición CpG se selecciona entre la posición 26, 81, 274, 335, 341 y 374 del amplicón No. 1255 de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 y la posición 45, 53, 96, 125, 133, 163, 205, 259, 263, 345, 349 y 382 del amplicón No. 2001 de acuerdo con la SEQ ID NO: 5.

40 El concepto de la invención se basa en la convertibilidad por bisulfito específica (y preferiblemente la desmetilación o no metilación) de regiones específicas de linfocito T auxiliar CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> en linfocitos T CD4<sup>+</sup> positivos. Mediante la utilización de un método PCR cuantitativa sencillo y preciso, los autores de la invención demuestran que el patrón específico de modificación de citosina de la región genética de CD4 representa un marcador específico para recuentos de linfocitos T CD4 en la sangre o los tejidos.

45 Los autores de la invención pudieron demostrar que en las células CD4<sup>+</sup> los motivos CpG son casi completamente convertibles por bisulfito (es decir, más de un 70%, preferiblemente un 80%, preferiblemente más de un 90% siendo

sobre todo preferible más de un 95%), mientras que los mismos motivos se metilan completamente en todas las células CD4<sup>+</sup>. Por lo tanto, la determinación de la convertibilidad por bisulfito de amplicones CD4 podría llegar a ser una herramienta valiosa para identificar linfocitos T auxiliares, tal como se requerirá o al menos será de algún valor para medir linfocitos T auxiliares en enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes, cáncer, alergia, inmunodeficiencias primaria y secundaria, como por ejemplo, infecciones por VIH y SIDA, o un estado inmune relacionado con linfocitos T auxiliares en cualquier contexto de diagnóstico concebible. El ensayo permite la medida de linfocitos T auxiliares sin purificación o cualquier procedimiento de tinción. Informa incluso en tumores sólidos u otros tejidos sólidos del número de células convertibles por bisulfito en dicha región, mostrando por tanto la cantidad total de linfocitos T infiltrados en el tumor CD4 positivos.

Los autores de la invención han descubierto una convertibilidad por bisulfito en los amplicones de CD4 humanos que se restringe a linfocitos T auxiliares cuando se ensayan contra todos los principales tipos de células de sangre periférica y una selección de células no sanguíneas. Estos datos indican que las modificaciones epigenéticas en los amplicones de CD4 sirven como valiosos marcadores para la identificación de células con el fenotipo de linfocito T, independientemente de la expresión de CD4.

Otro aspecto preferible del procedimiento según la presente invención, pues, comprende además la etapa de comparación de la cantidad relativa de linfocitos T CD4 según se detectan con linfocitos T CD3, linfocitos T CD8, linfocitos T reguladores, monocitos, granulocitos, células B, GAPDH, Th1, Th2, Th9, Th17 Th22, Tfh, NKT y NK, siendo sobre todo preferible con linfocitos T CD3, linfocitos T CD8, Treg y linfocitos T auxiliares. Mediante el empleo de esta etapa, se pueden determinar y establecer relaciones de marcadores y las correspondientes células diagnóstica y terapéuticamente útiles en función del análisis de la convertibilidad por bisulfito de al menos una posición CpG en un gen seleccionado entre genes específicos de célula de linfocitos T CD3, linfocitos T CD8, linfocitos T reguladores, monocitos, granulocitos, linfocitos B, GAPDH, Th1, Th2, Th9, Th17 Th22, Tfh, NKT y NK. Son preferibles las relaciones entre CD4 y CD3, CD-4 y CD-8, CD-4 y marcadores de linfocito T regulador, CD-4/marcadores de linfocito T auxiliar.

En un modo de realización preferido del procedimiento según la presente invención, dicho análisis de convertibilidad por bisulfito comprende la amplificación con al menos un cebador de oligómeros de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 6 a 13.

Preferiblemente, la amplificación implica una enzima polimerasa, una PCR o una reacción de amplificación química, u otros procedimientos de amplificación, tal como conocen las personas especializadas, tal como se describe a continuación, p.ej. en el contexto de MSP, HeavyMethyl, Scorpion, Ms-Snupe, MethylLight, secuenciación por bisulfito, ensayos de restricción específicos de metilo y/o PCR digital (véase, por ejemplo Kristensen and Hansen PCR-Based Methods for Detecting Single Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics and Response to Treatment Clinical Chemistry 55:8 1471 (2009)). Con la amplificación, se produce el amplicón del gen CD4 de cualquier parólogo u ortólogo tal como se describe en el presente documento, que es una "herramienta" particularmente preferible para llevar a cabo los procedimientos según la presente invención.

Las personas especializadas serán capaces además de seleccionar subgrupos específicos de posiciones CpG con el fin de minimizar la cantidad de sitios que se han de analizar, por ejemplo, al menos una posición CpG 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de las regiones que se han de analizar según la invención. Las posiciones se cuentan numéricamente desde el extremo 5' de un amplicón (p.ej. No. 1255, 1999, 2000 o 2001) a medida que se generan y analizan. Son preferibles las combinaciones de posiciones 4, 5, 6 o 7 que producen suficiente información como para ser informativas en el contexto de la presente invención, seleccionándose dicha posición CpG entre la posición 26, 81, 274, 335, 341 y 374 del amplicón No. 1255 de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, la posición 42, 60, 151, 259, 262, 299 y 312 del amplicón No. 1999 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, la posición 66, 84, 175, 283, 286, 323 y 336 del amplicón No. 2000 de acuerdo con la SEQ ID NO: 4, y la posición 45, 53, 96, 125, 133, 163, 205, 259, 263, 345, 349 y 382 del amplicón N° 2001 de acuerdo con la SEQ ID NO: 5.

Con el fin de analizar la convertibilidad por bisulfito de posiciones CpG, se puede aplicar cualquiera de los procedimientos conocidos para analizar metilación de ADN. En un modo de realización preferible del procedimiento según la presente invención, el análisis del estado de metilación comprende un procedimiento seleccionado entre digestos enzimáticos específicos de metilación, secuenciación por bisulfito, análisis seleccionado entre metilación de promotor, metilación de isla CpG, MSP, HeavyMethyl, MethylLight, Ms-SNuPE u otros procedimientos que se basan en una detección del ADN amplificado. Dichos procedimientos son muy conocidos entre las personas especializadas y se pueden encontrar en la correspondiente bibliografía.

En un modo de realización preferible del procedimiento según la presente invención, dicho procedimiento es adecuado para aplicaciones de rutina, por ejemplo, en un chip de ADN. En función de la información dada y la correspondiente bibliografía, las personas especializadas podrán ajustar el procedimiento según lo anterior a dichas situaciones.

En otro modo de realización preferible del procedimiento según la presente invención, la identificación comprende una distinción de dichos linfocitos T CD4<sup>+</sup> desde todos los principales tipos de células de sangre periférica y/o células no sanguíneas, preferiblemente, pero sin limitarse sólo a ellos, entre linfocitos CD19<sup>+</sup>, linfocitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>,

granulocitos CD15<sup>+</sup>, monocitos CD14<sup>+</sup>, linfocitos citolíticos naturales CD56<sup>+</sup> y linfocitos T citolíticos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y, además, por ejemplo, hepatocitos, miocitos, condrocitos, queratinocitos y muchos otros tipos de células derivadas de otros órganos diferentes a la sangre.

5 En otro modo de realización preferible del procedimiento según la presente invención más, la muestra se selecciona entre un fluido corporal de mamífero, incluyendo muestras de sangre humana, o un tejido, órgano o una muestra de leucocitos o una fracción purificada o separada de dicho tejido, órgano o leucocitos, o una muestra de tipo celular. Preferiblemente, dicho mamífero es un ratón, una rata, un mono o un ser humano. Las muestras se pueden agrupar adecuadamente, si se requiere.

10 Otro aspecto preferible del procedimiento según la presente invención comprende pues además la etapa de concluir sobre el estado inmune de dicho mamífero en función de dichos linfocitos T según se hayan identificado. Se puede cuantificar la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y utilizarse como punto de referencia para cuantificar correspondientemente otras subpoblaciones más detalladas (tales como Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Treg, Tfh) o se puede utilizar como factor de detección predictivo y/o de tamizaje y/o diagnóstico y/o pronóstico y/o eventos adversos, o se puede utilizar para detectar finalmente esta población para determinar el estado de actividad inmune global.

En otro modo de realización preferible de los procedimientos según la presente invención más, el mamífero sufre o presenta la probabilidad de sufrir una inmunodeficiencia primaria o secundaria, como SIDA, enfermedades autoinmunes, rechazo a trasplantes, cáncer, enfermedades infecciosas, y/o alergia, tales como, pero sin limitarse sólo a ellas, linfocitopenia idiopática CD4<sup>+</sup>, VIH, gastritis, diabetes, colitis y lupus eritematoso.

20 Otro aspecto preferible del procedimiento según la presente invención se refiere a un procedimiento para monitorizar el nivel de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en un mamífero que comprende un procedimiento según lo anterior y la comparación de la cantidad de CD3<sup>+</sup>, es decir, el total de linfocitos T tal como se identifica para una muestra tomada con anterioridad o en paralelo del mismo mamífero y/o una muestra de control. En otro modo de realización preferible de los procedimientos según la presente invención más, el mamífero sufre o presenta la probabilidad de sufrir inmunodeficiencia primaria o secundaria, enfermedad autoinmune, rechazo a trasplantes, cáncer, y/o alergia, como por ejemplo, pero sin limitarse sólo a ellas, linfocitopenia idiopática CD4<sup>+</sup>, VIH, gastritis, diabetes, colitis y lupus eritematoso.

30 Otro aspecto preferible del procedimiento según la presente invención se refiere pues a un procedimiento como el anterior que comprende además la medición y/o monitorización de la cantidad de dicha cantidad de linfocitos T CD<sup>+</sup> como respuesta a sustancias químicas y/o biológicas administradas a dicho mamífero, es decir, como respuesta al tratamiento de dicho paciente. En función de los resultados obtenidos según el (los) procedimiento(s) de la invención, el médico responsable tendrá capacidad para sacar conclusiones sobre el estado inmune del paciente y ajustar un tratamiento de la enfermedad subyacente en consecuencia.

35 Se describe un oligómero de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 6 o 7, un oligómero basado en la SEQ ID NO: 1, la región convertible por bisulfito no metilada específica de linfocito T auxiliar CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o un amplicón seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 5.

40 Asimismo se describe un kit para la identificación y/o monitorización de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, en particular linfocitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> en un mamífero en función del análisis de la convertibilidad por bisulfito de al menos una posición CpG en la región convertible por bisulfito no metilada específica de linfocito T auxiliar CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y/o al menos un amplicón seleccionado entre cualquiera de la SEQ ID NO: 2 a 5 que comprende materiales para llevar a cabo un procedimiento según la presente invención tal como se ha descrito en el presente documento. Preferiblemente, dicho kit comprende a) un reactivo de bisulfito, y b) materiales para el análisis de la convertibilidad por bisulfito de al menos una posición CpG seleccionada entre la posición 26, 81, 274, 335, 341 y 374 del amplicón No. 1255 de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, la posición 42, 60, 151, 259, 262, 299 y 312 de amplicón No. 1999 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, la posición 66, 84, 175, 283, 286, 323 y 336 del amplicón No. 2000 de acuerdo con la SEQ ID NO: 4, y la posición 45, 53, 96, 125, 133, 163, 205, 259, 263, 345, 349 y 382 de amplicón N° 2001 de acuerdo con la SEQ ID NO: 5. Es más preferible que las posiciones consistan en posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 en la región no metilada específica de linfocito T auxiliar CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y/o dichos amplicones. Son preferibles sobre todo las posiciones 5 o 6 o todas las posiciones en la región no metilada específica de linfocitos T auxiliares CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y/o dichos amplicones.

55 Asimismo, se describe el uso de un oligómero o amplicón o un kit para identificar y/o monitorizar linfocitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> en un mamífero. En suma, utilizando el marcador CD4, los autores de la invención han identificado muy específicamente, cuantificado y diferenciado en particular linfocitos T CD4 positivos, tanto como tales como en su relación con otros tipos de células, en una muestra, por ejemplo, el total de linfocitos T utilizando los marcadores epigenéticos para CD3, o su asociación con linfocitos T citotóxicos CD8 utilizando el marcador CD8beta y/o CD8alfa. A través de dichos medios, se podrían distinguir además linfocitos T CD8 positivos de linfocitos CD4, por ejemplo. Según esto, cuando se utiliza una combinación del(los) marcador(es) de la presente invención y el marcador CD8beta, se pueden distinguir específicamente células CD4 y CD8. Antes de la invención esto no era posible ya que la expresión de proteína del marcador CD4 no puede utilizarse para identificar y cuantificar fiablemente linfocitos T

CD4, ni tampoco era posible proporcionar una tecnología de rutina para la cuantificación de estos tipos de células a partir de una muestra de sangre entera (fresca, embebida o congelada) o una muestra de tejido sin medios de conservación específicos.

5 A continuación se describirá mejor la invención en función del siguiente ejemplo y haciendo referencia a las figuras adjuntas y el listado de secuencias, sin limitarse solo a esto. En las figuras y las secuencias,

10 La Figura 1 muestra el análisis de sitios CpG sobre amplicones No. 1255 (SEQ ID NO: 2), No. 1999 (SEQ ID NO: 3), No. 2000 (SEQ ID NO: 4) y No. 2001 (SEQ ID NO: 5), así como amplicones de control (negativos) No. 32, 33, 1980, 1981 y 1981 de poblaciones de leucocitos. Los números de la izquierda indican la correspondiente posición CpG en el amplicón correspondiente. Las abreviaturas en la parte inferior significan BLC15-linfocitos B CD19<sup>+</sup>, CD4 – linfocitos T auxiliares CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CTL – linfocitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, GRC – granulocitos CD15<sup>+</sup>, MOC – monocitos CD14<sup>+</sup>, NKC – linfocitos citolíticos naturales CD56<sup>+</sup>; y NKT – linfocitos T citolíticos naturales CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>.

La figura 2 muestra la posición de la región no metilada específica de linfocito T auxiliar CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y la alineación de amplicones tal como se analiza (barras en la parte inferior) contra esta región.

15 La SEQ ID NO: 1 presenta la secuencia genómica de la región convertible por bisulfito no metilada específica de linfocito T auxiliar CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>.  
 La SEQ ID NO: 2 presenta la secuencia genómica del amplicón N° 1255  
 La SEQ ID NO: 3 presenta la secuencia genómica del amplicón N° 1999  
 La SEQ ID NO: 4 presenta la secuencia genómica del amplicón N° 2000  
 20 La SEQ ID NO: 5 presenta la secuencia genómica del amplicón N° 2001  
 La SEQ ID NO: 6 a 13 presenta las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación del amplicón 1255, 1999, 2000 y 2001, respectivamente.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 25 Análisis de CD4

Los autores de la invención han purificado varios subgrupos de sangre, incluyendo CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, linfocitos T no tratados previamente y de memoria CD3<sup>+</sup>/CD8, linfocitos citolíticos naturales CD56<sup>+</sup>, linfocitos B no tratados previamente y de memoria CD19<sup>+</sup>, monocitos CD14<sup>+</sup> y granulocitos CD15<sup>+</sup>. Se trató con bisulfito ADN de células purificadas y se analizó en varios motivos de dinucleótido CpG. A continuación, los autores de la invención compararon la no convertibilidad por bisulfito (encontrando C para la citosina que estaba metilada en la secuencia original frente a T para la citosina que no estaba metilada en la secuencia original y, por lo tanto, se convirtió con bisulfito).

35 Los datos presentaron varias posiciones de CpG en la región de CD4 que no fueron metiladas en todos los linfocitos T CD3CD4 al tiempo que fueron metiladas en todos los demás tipos de células sanguíneas. En la SEQ ID NO: 1 se muestra la región genética diferencialmente modificada con citosina tal como se encontró para CD4.

Como ejemplos para esta región, se observó que varios amplicones presentaban una clara no metilación (en concreto No. 1255, No. 1999, No. 2000 y No. 2001, véase Figura 1), mientras que las regiones fuera de la región convertible por bisulfito no metilada específica de linfocito T auxiliar CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> según la presente invención fueron metiladas (tal como se muestra con los amplicones No. 32, 33 y 1980-82, véase también la Figura 1).

40 Los datos fueron inequívocos para los tipos de célula purificada. De forma abrumadora, ninguno de los linfocitos T CD4 se metiló en ninguna las posiciones CG analizadas (véase Figura 1), mientras que todos los demás tipos de células analizados se metilaron en posiciones idénticas.

A modo de ejemplo, durante los análisis, se amplificaron los amplicones 1255, 1999, 2000 y 2001 con los siguientes oligonucleótidos (cebadores) respectivamente:

45 1255r: (SEQ ID NO: 6) 5'-TTCTTACAAAACCAATTTTCCT-3'  
 1255q: (SEQ ID NO: 7) 5'-GGTTTAGGAGGGGTTGTATATT-3'  
 1999r: (SEQ ID NO: 8) 5'-CCCCTCATAAACTTCTTCTAAA-3'  
 1999q: (SEQ ID NO: 9) 5'-TAGTATTAGTGGTGGGAGGAGT-3'  
 2000r: (SEQ ID NO: 10) 5'-ACTATCCCAATATCCTCTACTT-3'  
 2000q: (SEQ ID NO: 11) 5'-GGGTTAGAGTTTAGGGTTGTT-3'  
 50 2001p: (SEQ ID NO: 12) 5'-GTGTTAGATAGAGTTTGGGGT-3'  
 2001o: (SEQ ID NO: 13) 5'-TCTAAAATATACAAAACCAAT-3'

**Ejemplo 2**

Monitorización de niveles de CD4 en pacientes de cáncer que están recibiendo tratamiento.

5 Los autores de la invención cuantificaron la cantidad de linfocitos T CD3+ y CD4+, así como el nivel de linfocitos T CD4+, como porción de la fracción de linfocito T CD3+ valorando la convertibilidad por bisulfito de ADN en el amplicón No. 2000 de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 (Tabla 1). Durante la terapia, se utilizaron muestras de sangre periférica en dos puntos en el tiempo diferentes.

10 Los resultados presentan cambios del nivel de linfocitos T CD4+ específicos del paciente y una porción reducida de células CD4+ en relación con el nivel de linfocitos T CD3+ durante el seguimiento de la terapia contra el cáncer, lo que está relacionado con la eficacia del fármaco, puede indicar un pronóstico del resultado y/o puede también predecir la eficacia y seguridad de la terapia.

**Ensayo CD4**

Muestras	PCR específica para TpG (locus específico de tipo de célula convertible con bisulfito)		Frente a		PCR específica para (locus independiente de tipo de célula) convertible por bisulfito		% CD4
	Valor CP	Unidades normales			Valor CP	Unidades normales	
P1-1	29,54	326,33			26,76	3183,33	10,25
P1-2	28,54	633,33			25,56	7310	8,66
P2-1	28,93	487,67			25,59	7170	6,8
P-2-2	26,71	2096,67			23,78	24966,67	8,4

**Ensayo CD3**

Muestras	PCR específica para TpG (locus específico de tipo de célula convertible con bisulfito)		Frente a		PCR específica para (locus independiente de tipo de célula) convertible por bisulfito		% CD3	%CD4/CD3
	Valor CP	Unidades normales			Valor CP	Unidades normales		
P1-1	29,97	540,67			26,76	3183,33	16,98	60,4
P1-2	27,75	2556,67			25,56	7310	34,97	24,8
P2-1	29,59	708			25,59	7170	9,87	68,9
P-2-2	26,4	6600			23,78	24966,67	26,44	31,8

Tabla 1: Valoración de los niveles de linfocitos T CD4+ y CD3+ de dos pacientes (P1, P2) con determinada terapia. Se valoraron dos puntos en el tiempo (1 y 2). Cálculo de niveles de células CD4+ y CD3+ seguido de la cuantificación de regiones que contienen CpG convertibles a través de valor qPCR (valor CP) para medir; (Unidades normales) unidades que corresponden a los valores CP calculados de la curva patrón; (% CD3, % CD4) en relación con la cantidad de células. Porcentaje de CD4 como porción de CD3 (%CD4/CD3).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Epiontis GmbH

5 <120> Marcador epigenético para la identificación de linfocitos T CD3CD4 positivos

<130> E31553PCT

<150> US 61/609,580

10 <151> 12-03-2012

<160> 13

<170> Versión PatentIn 3.5

15 <210> 1

<211> 1964

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <400> 1

ES 2 618 506 T3

agggagtgaa gactggagac tatcccaggc tgggaaaggc gtggaaggca actagtcgtg	60
ggcagttgag gggagaagac tggaagaggg gaaaagagga gaaaaagagt gaagaagggg	120
agggaaaaaa ttagaaagaa taaataaata taaggtggga ggaaacctat aaaaaagaaa	180
tgatgaggaa aaacataaaa acaagaaaaa gagcaaaaaga agtggaatct agtctagaga	240
aaattcttgc aaaaccaatt ttccttaacg ggacaatctc caaaaattga caccaaatat	300
catacttgca gcatttcata agtcgcatga tctatgtaat agtctctttt aactaccttt	360
tgtgtttctg tgtgtatttt taaatttttg tctgcttctt tgctctttta agatttttga	420
acaatgtcta aaggcacttc tactctagtt agctttaaaa tgattcatga aataggaag	480
ctaaaattct cagaaagtgt tgaaactgag cttttgcgta tgaattgcc taaaagtgc	540
agatacatat ctttagataa atatgtcatt taagaaacgg attcgaaaag aattggtggt	600
aggggtctca tgaggccggg agagttacag aaggatgtgc agcccctcct gggcctggca	660
gggtgtgagg gagagtgagg actcactgtc cctcctgaag ggaagccctg tgccatctca	720
gcctttccgc cctcagacct ttccagcccc tgagacctca tggccttgaa gccgtgctat	780
ccccagtgtc ctctgctttc ccctcatagg cttcttctgg gagagaggtt tcctggggta	840
cgttctgatc cctcaaaacg gaaaggccct gttctcaata attcaaagat ttcactctga	900
gtgggatagt gcttcctgaa tgccctgctc ttgtggtgga catttttatc ggggcaaggc	960
taagagcagg gcctgatggg ggaagtcact gctacttcac attttgacca ataattcctt	1020
gtgctgtatc agatgctgta ggctgataca aaatggccgc cgccctcaa gtcagatgaa	1080
agagcccctg aggacagcgt tagagacact ogggagatga tttccctctt tcaatgtggg	1140
agcacttaca taggagaggt ctatatctag ataaaaactc ctcccaccac tgggtgtaga	1200
cagagcttgg gggcagccct aggctctgac cctggccgta atggcggggg ggtgctgagg	1260

ES 2 618 506 T3

gcaattggct agaccaattg tcttgcacgt tttatTTTT attattattt ttgagacgga 1320  
 gtctcgctct cttgccagg ctggagtgca atgacgtgat ctccactcac tgcagcctcc 1380  
 acctcctggg ttcaagcgat tctcctgcct cagcctcttg agtagctggg attacaggag 1440  
 cccaacacca cgcccgcta ctttttgtat ttttagtaga gaccaggttt cactatgttg 1500  
 gacaggctgg cctcaaactc ctggcctcaa atgatccgcc cgccttggcc toccaaagtg 1560  
 ctggcattac agacgtgagc caccatactg ggccagtctt gcacatttta gacactcaat 1620  
 aatgtttgt tgaatgaaat acctgtgatg ggccggcgt ggtggcccac accagtaatc 1680  
 ccagcccttt gagaggccga ggcaggagga tggcttgaac ctgggagttt gagaccagcc 1740  
 tgggcaacat ggtgaaacc ccatctctac aaaccccaca aaagttagct gggcatggtg 1800  
 gtgtgtgcct gtggttccag ctacttggga agctgaggtg ggaggattgc ttgagcctgg 1860  
 gagacggagg ctgcagtgag gcctgactgt gccactgcac tccagcctgg gcgagagtga 1920  
 ggccctgtct caaataact ttgatgaagg tggggaatca gaag 1964

5 <210> 2  
 <211> 412  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

ttcttgcaaa accaattttc cttaacggga caatctcaa aaattgacac caaatatcat 60  
 acttgacgca tttcataagt cgcatgatct atgtaatagt ctcttttaac taccttttgt 120  
 gtttctgtgt gtatttttaa attttgtct gcttctttgc tcttttaaga tttttgaaca 180  
 atgtctaaag gcacttctac tctagttagc tttaaaatga ttcatgaaat aggaaagcta 240  
 aaattctcag aaagtgttga aactgagctt ttgctgatga attgccctaa aagttgcaga 300  
 tacatatctt tagataaata tgtcatttaa gaaacggatt cgaaaagaat tgggtgtagg 360  
 ggtctcatga ggccgggaga gttacagaag gatgtgcagc ccctcctggg cc 412

10 <210> 3  
 <211> 399  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 618 506 T3

cccctcatag gcttcttctg ggagagaggt ttcctggggg acgttctgat ccctcaaac 60  
 ggaaaggccc tgttctcaat aattcaaaga tttcactctg agtgggatag tgcttctga 120  
 atgccctgct cttgtggtgg acatttttat cggggcaagg ctaagagcag ggcctgatgg 180  
 gggaagtac tgctacttca cattttgacc aataattcct tgtgctgtat cagatgctgt 240  
 aggctgatac aaaatggccg ccgccctcaa agtcagatga aagagcccct gaggacagcg 300  
  
 ttagagacac tcgggagatg atttccctct ttcaatgtgg gagcacttac ataggagagg 360  
 tctatatcta gataaaaact cctcccacca ctggtgcta 399

5 <210> 4  
 <211> 457  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 gctatcccca gtgtcctctg ctttcccctc ataggcttct tctgggagag aggtttcctg 60  
 gggtagcttc tgatccctca aaacggaaag gccctgttct caataattca aagatttcac 120  
 tctgagtggg atagtgcttc ctgaatgcc tgctcttctg gtggacattt ttatcggggc 180  
 aaggctaaga gcagggcctg atgggggaag tctactgctac ttcacatttt gaccaataat 240  
 tccttgtgct gtatcagatg ctgtaggctg atacaaaatg gccgccgcc tcaaagttag 300  
 atgaaagagc ccctgaggac agcgttagag aactcggga gatgatttcc ctctttcaat 360  
 gtgggagcac ttacatagga gaggtctata tctagataaa aactcctccc accactggtg 420  
 ctagacagag cttgggggca gccctaggct ctgacct 457

10 <210> 5  
 <211> 420  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 5  
 gtgctagaca gagcttgggg gcagccctag gctctgacct tggccgtaat ggcggggtgg 60  
 tgctgagggc aattggctag accaattgtc ttgcacgttt tattttttat tattattttt 120  
 gagacggagt ctgctctctc tgcccaggct ggagtgcaat gacgtgatct cactcactg 180  
 cagcctccac ctcttgggtt caagcgattc tcctgcctca gcctcttgag tagctgggat 240  
 tacaggagcc caacaccacg cccggctact ttttgtattt ttagtagaga ccaggtttca 300  
 ctatgttggg caggctggcc tcaaactcct ggcctcaaat gatccgcccg ccttggcctc 360  
 ccaaagtgct ggcattacag acgtgagcca ccatactggg ccagtcttgc acattttaga 420

15 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 6  
 ttctacaaa accaattc ct 22

# ES 2 618 506 T3

<210> 7  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

5 <400> 7  
ggtttaggag ggggtgata tt 22

<210> 8  
<211> 22  
<212> ADN  
10 <213> Homo sapiens

<400> 8  
cccctataa acttctcta aa 22

<210> 9  
<211> 22  
<212> ADN  
15 <213> Homo sapiens

<400> 10  
actatcccca atactctcta ctt 23

<210> 11  
<211> 11  
<212> ADN  
20 <213> Homo sapiens

<400> 11  
gggtagagt ttaggtgt t

25 <210> 12  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
30 gtgtagata gagtgggg gt

<210> 13  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

35 <400> 13  
tctaaaatat acaaaactaa cccaat 26

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para identificar linfocitos T auxiliares CD4+ en una muestra que comprende células de sangre derivadas de un mamífero, que comprende el análisis de la convertibilidad por bisulfito de al menos una posición CpG en la región convertible por bisulfito específica de linfocito T auxiliar CD3+CD4+ de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, en el que una conversión por bisulfito de al menos una posición CpG, en al menos un 90% en dicha muestra, es indicativa de un linfocito T auxiliar CD4+,  
 en el que dicha al menos una posición CpG está presente en un amplicón seleccionado del grupo de amplicón No. 1255 de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, No. 1999 de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, No. 2000 de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 y No. 2001 de acuerdo con la SEQ ID NO: 5.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha al menos una posición CpG se selecciona de la posición 26, 81, 274, 335, 341 y 374 del amplicón No. 1255 de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 y de la posición 45, 53, 96, 125, 133, 163, 205, 259, 263, 345, 349 y 382 del amplicón No. 2001 de acuerdo con la SEQ ID NO: 5.
- 15 3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el análisis de la convertibilidad por bisulfito comprende un procedimiento seleccionado de digestos enzimáticos específicos de metilación, secuenciación por bisulfito, análisis seleccionados de metilación de promotor, metilación de isla CpG, MSP, HeavyMethyl, MethylLight, Ms-SNuPE y otros procedimientos que se basan en una detección de ADN amplificado.
- 20 4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además el análisis de la convertibilidad por bisulfito de al menos una posición CpG en los genes para CD3 y/o CD8, en particular CD8 alfa y CD8 beta, o en el gen para GNGT2.
- 25 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha identificación comprende una distinción de dichos linfocitos T entre todos los principales tipos de células de sangre periférica y células no sanguíneas, en particular, linfocitos B.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha muestra se selecciona de un fluido corporal de mamífero, incluyendo muestras de sangre humana, o una muestra de tejido, órgano, o sangre de tipo celular, una muestra de linfocitos de la sangre o una fracción de la misma.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho mamífero es un ratón, una rata, un mono o un ser humano.
- 30 8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además la etapa de conclusión sobre el estado inmune de dicho mamífero, en función de dichos linfocitos T auxiliares según se identifican.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además la etapa de cuantificación de la cantidad relativa de linfocitos T CD4, en lavase a la comparación de las cantidades relativas de dicha convertibilidad por bisulfito en las regiones, según se analiza con las cantidades relativas de la convertibilidad por bisulfito en el gen de control, tal como, por ejemplo, GAPDH.
- 35 10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho mamífero padece o presenta la probabilidad de padecer enfermedades autoinmunes, rechazos de trasplante, cáncer y/o alergia.
- 40 11. Un procedimiento para monitorizar el nivel de linfocitos T auxiliares CD4+, en particular linfocitos T CD3+CD4+, en un mamífero, que comprende un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y la comparación de la cantidad del total de linfocitos T CD3+ según se identifica en una muestra tomada previamente, o en paralelo, del mismo mamífero, y/o una muestra de control.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, que comprende además la medición y/o monitorización de la cantidad de dichos linfocitos T auxiliares como respuesta a sustancias químicas y/o biológicas administradas a dicho mamífero.

Figura 1

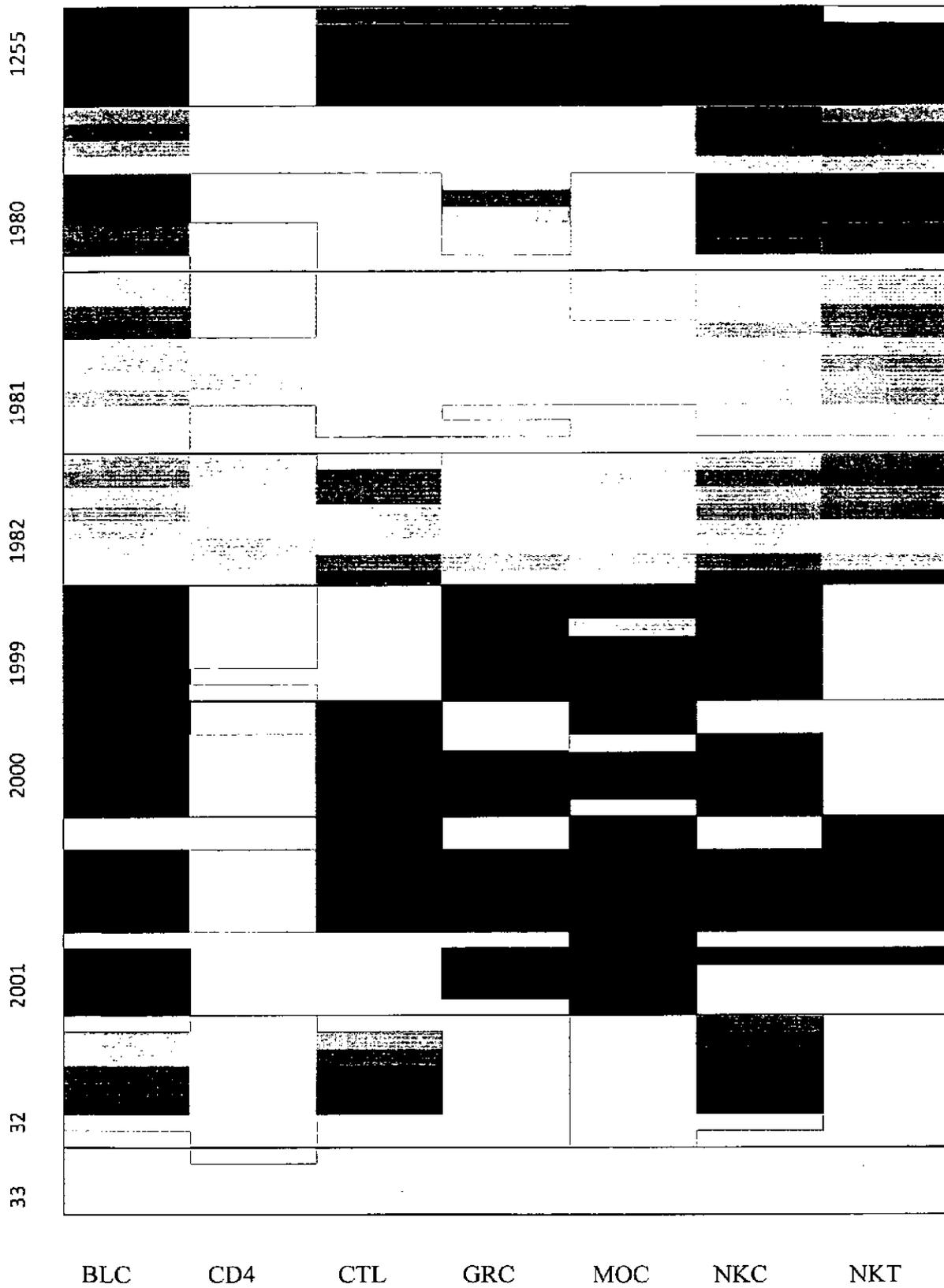


Figura 2

