

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 846**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2011 PCT/EP2011/056871**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2011 WO11135088**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2011 E 11716573 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2563932**

54 Título: **Detección de células inmunes, en particular linfocitos T mediante análisis de metilación de ADN de los genes CCR6**

30 Prioridad:

29.04.2010 US 329229 P

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

07.03.2018

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 2 657 846 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 de células inmunes, en particular linfocitos T mediante análisis de metilación de ADN de los genes CCR6

La presente invención se refiere a un procedimiento, en particular, un procedimiento *in vivo*, para la identificación de determinadas células inmunes de un mamífero, que comprende el análisis del estado de metilación de al menos una posición CpG en el gen CCR6 y el uso de análisis de metilación de ADN de los genes de las proteínas CCR6 para una detección y garantía de calidad y control de determinadas células inmunes. En particular, la presente invención se refiere al análisis del estado de metilación de al menos una posición CpG en el gen CCR6 en linfocitos T. Adicionalmente, la presente invención se refiere a un kit para realizar los procedimientos anteriores, así como a sus respectivos usos.

10 Antecedentes de la invención

Patrones específicos de la expresión de receptor de quimiocinas aseguran una migración orquestada de leucocitos por todo el organismo, en los que las células inmunes se dirigen a sus tejidos diana tanto en un estado estable como en condiciones inflamatorias. El receptor de quimiocinas CCR6 se expresa ampliamente en la sangre humana leucocitos de tejidos, entre ellos subconjuntos de células dendríticas, linfocitos T de CD45RO+ efector/memoria, linfocitos T reguladores CD25^{alto} (Treg), linfocitos B de memoria e intactos, células NKT y células NK (Berahovich RD, Lai NL, Wei Z, Lanier LL, Schall TJ. Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression. J Immunol. 2006;177:7833-7840.). En los linfocitos T de memoria, el CCR6 se expresa en una población de células productoras de IL-10 auto-reactivas (Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, y col. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. J Exp Med. 1998;188:373-386.) y en la mayoría de células migrada dirigidas por mucosa y piel. Varios estudios han demostrado adicionalmente que el CCR6 está expresado de forma consistente sobre linfocitos T CD4+ productores de IL-17 inflamatorios (Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, y col. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. J Exp Med. 2007;204:2803-2812.) los cuales están inculcrados en una amplia variedad de enfermedades inflamatorias adversas, tal como artritis reumatoide, enfermedad psoriásica, enfermedad inflamatoria intestinal o encefalopatías en ratones y hombres (Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, y col. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. J Exp Med. 2007;204:2803-2812. Ruth JH, Shahrara S, Park CC, y col. Role of macrophage inflammatory protein-3alpha and its ligand CCR6 in rheumatoid arthritis. Lab Invest. 2003;83:579-588. Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, y col. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. J Immunol. 2000;164:6621-6632. Hedrick MN, Lonsdorf AS, Shirakawa AK, y col. CCR6 is required for IL-23-induced psoriasis-like inflammation in mice. J Clin Invest. 2009;119:2317-2329. Kaser A, Ludwiczek O, Holzmann S, y col. Increased expression of CCL20 in human inflammatory bowel disease. J Clin Immunol. 2004;24:74-85. Riboldi A, Coisne C, Baumjohann D, y col. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. Nat Immunol. 2009;10:514-523. Varona R, Cadenas V, Flores J, Martinez AC, Marquez G. CCR6 has a non-redundant role in the development of inflammatory bowel disease. Eur J Immunol. 2003;33:2937-2946. Matsui T, Akahoshi T, Namai R, y col. Selective recruitment of CCR6-expressing cells by increased production of MIP-3 alpha in rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol. 2001;125:155-161.).

Se asume de forma extensa que la diferenciación de linfocitos T en subconjuntos de memoria especializados también implica la adquisición y expresión estable de repertorios de receptores de direccionamiento y de quimiocinas, permitiendo el tráfico de tejidos o específico de inflamación de estos subconjuntos (Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. Science. 1996;272:60-66.). Sin embargo, algunos estudios también informan sobre una considerable plasticidad en la expresión de receptores de direccionamiento. No se conoce si esto también se aplica a la expresión de CCR6. La expresión de CCR6 puede ser inducida *de novo* sobre linfocitos T intactos simulados por TCR mediante un cóctel de citocinas pro-inflamatorias en combinación con TGF- β (Acosta-Rodríguez EV, Rivino L, Geginat J, y col. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. Nat Immunol. 2007;8:639-646.).

Se ha proporcionado una evidencia creciente en los últimos años que la diferenciación de linfocitos T en distintos linajes con fenotipos y funciones estables implica la regulación epigenética de moléculas efectoras críticas (Ansel KM, Lee DU, Rao A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. Nat Immunol. 2003;4:616-623. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood. 2008;112:1557-1569. Wilson CB, Rowell E, Sekimata M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. Nat Rev Immunol. 2009;9:91-105.) o factores de transcripción específicos de linajes tales como Foxp3 in Treg (Floess S, Freyer J, Siewert C, y col. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. PLoS Biol. 2007;5:e38. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? Nat Rev Immunol. 2009;9:83-89. Baron U, Floess S, Wiczorek G, y col. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. Eur J Immunol. 2007;37:2378-2389.). Solo unos pocos estudios proporcionaron evidencia que las moléculas implicadas en el tráfico están sometidas a regulación epigenética en los linfocitos T (Scotet E, Schroeder S, Lanzavecchia A. Molecular regulation of CC-chemokine receptor 3 expression in human T helper 2 cells. Blood. 2001;98:2568-2570. Syrbe U, Jennrich S, Schottelius A, Richter A, Radbruch A, Hamann A. Differential regulation of P-selectin ligand expression in naive versus memory T cells: evidence for epigenetic

- regulation of involved glycosyltransferase genes. *Blood*. 2004;104:3243-3248) o células cancerígenas (Sato N, Matsubayashi H, Fukushima N, Goggins M. The chemokine receptor CXCR4 is regulated by DNA methylation in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther*. 2005;4:70-76. Mori T, Kim J, Yamano T, y col. Epigenetic up-regulation of C-C chemokine receptor 7 and C-X-C chemokine receptor 4 expression in melanoma cells. *Cancer Res*. 2005;65:1800-1807).
- 5 Baba y col. (in Baba, M., Imai, T., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Hieshima, K., Nomiya, H. y Yoshie, O. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC J. *Biol. Chem*. 272 (23), 14893-14898 (1997)) describen la identificación de CCR6; la entrada de base de datos NP_004358 desvela la secuencia de aminoácidos de quimiocinas humanas (C-C motif) receptor 6.
- 10 Rubie y col. (in Rubie,aba, C., Oliveira, V., Kempf, K., Wagner, M., Tilton, B., Rau, B., Kruse, B., Konig, J. y Schilling, M. Involvement of chemokine receptor CCR6 in colorectal cancer metastasis *Tumour Biol*. 27 (3), 166-174 (2006) propone una asociación entre la expresión CCL20/CCR6 en cáncer colorrectal humano y la promoción de metástasis hepática colorrectal. Para esto, se analizaron 30 muestras humanas de tejido colorrectal, 30 muestras de metástasis hepáticas colorrectales y los tejidos del hígado adyacentes usando RCP en tiempo real, análisis por Transferencia
- 15 Western, histoquímica, microdissección y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Mientras que se encontró una sobreexpresión de todos los receptores de quimiocinas en CRC, en metástasis hepáticas colorrectales solo los receptores de quimiocinas CXCR4 y CCR6 se regularon positivamente de forma significativa.
- El documento WO 03/014153 describe CCR6 igual de similar que receptores de virus celulares y procedimientos de uso de dichos receptores.
- 20 No se ha descrito un contexto entre la metilación de CCR6 y determinados tipos de células inmunes, en particular linfocitos T .
- Koenen Hans JPM y col. in "Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells.", *Blood* (2008-09-15), vol. 112, n.º 6, páginas 2340 - 2352 desvela análisis de expresión de marcadores que caracterizan los Treg productores de IL17. Uno de los marcadores de expresión es ccr6. El documento sugiere que
- 25 la modificación epigenética subyace la plasticidad de los Treg, sin embargo, el procedimiento usado para la detección de células Treg es la citometría de flujo que no es fiable para la identificación de células estables.
- Aunque casi todas las células en un individuo contienen exactamente el mismo complemento de código de ADN, organismos superiores deben imponer y mantener distintos patrones de expresión de genes en los diversos tipos de tejidos. La mayoría de la regulación génica es transitoria, dependiendo del estado actual de la célula y los cambios
- 30 en los estímulos externos. La regulación persistente, por otra parte, es un papel principal de los patrones reguladores heredables de la epigenética que no alteran la codificación genética básica del ADN. La metilación de ADN es la forma arquetípica de la regulación epigenética; sirve como la memoria estable para las células y desarrolla un papel fundamental en el mantenimiento de la identidad a largo plazo de diversos tipos de células.
- El objetivo principal de la metilación es la secuencia de dos nucleótidos Citosina-Guanina (un 'sitio CpG'); en este contexto, la citosina (C) puede someterse a una modificación química simple para convertirse en 5-metil-citosina. En el genoma humano, la secuencia CG es más rara de lo esperada excepto en determinados grupos relativamente
- 35 densos denominados 'islas CpG'. Las islas CpG se asocian frecuentemente 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.).
- 40 La metilación aberrante de ADN acompaña frecuentemente la transformación de células sanas a cancerígenas. Entre los efectos observados se encuentran la hipometilación de genoma completo, metilación aumentada de genes supresores tumorales 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). Los perfiles de metilación se han reconocido ser específicos a un tumor (es decir, cambios en el patrón de metilación de genes
- 45 particulares o incluso CpG individuales son diagnóstico de tipos de tumores particulares) y actualmente existe una amplia colección de marcadores diagnósticos para los cánceres de vejiga, de la mama, de colon, de estómago, estómago, hígado, de pulmón y de próstata (resumido por Laird, *Nature Reviews/Cancer* 3:253-266, 2003).
- El control epigenético mediante metilación es esencial para el desarrollo prematuro que incluye la embriogénesis, inactivación e impronta de cromosoma X (silenciamiento monoalélico) del alelo o paternal o maternal (Erich, *J Cellular Chem* 88:899-910, 2003). También hay una clase de gen que se encuentra activo en la línea germinal, pero se silencia mediante metilación en las células somáticas (Bird, *Genes and Dev* 16:6-21,2002; Li, *Nature Reviews/Genetics* 3:662-673, 2002).
- 50 La metilación tejido-específica también sirve para la regulación de tipos/etapas celulares adultas y en algunos casos se ha establecido una relación causal entre la metilación y expresión génica. Lo que sigue es una lista parcial de genes, para los cuales los cambios de metilación están muy implicados en el control de la expresión génica de un modo tejido-específico: 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 subproducto de alguna otra regulación primaria o se requiere para bloquear el gen en el estado "inactivo" (Erich, J
- 55

Cellular Chem 88:899-910, 2003). Para las presentes aplicaciones (identificación/es de células inmunes), no se requiere una relación causal (biológica), pero solamente una fuerte correlación entre patrones de metilación y tipos celulares.

5 Un ejemplo publicado previamente para tal tipo celular y estado celular se encuentra una modificación específica de determinadas regiones génicas durante el compromiso de linaje de linfocitos T con respecto a linfocitos T colaboradores (Th1 o Th2). Los linfocitos T CD4+ intactos (no estimulados) se vuelven activados al encontrarse con un antígeno y pueden comprometerse a destinos celulares alternativos mediante estimulación adicional mediante interleuquinas. Los dos tipos de linfocitos T colaboradores muestran patrones recíprocos de expresión génica; El Th1 produce un Interferón-gamma (IFN- γ) y silencia IL-4, mientras que el 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 está inversamente correlacionada con la metilación de los sitios CpG próximos. En los linfocitos T intactos y Th2 el IFN- γ y el promotor se someten a metilación, pero no en los linfocitos Th1 en el que se expresa el IFN- (Attwood y col., CMLS 59:241-257, 2002). A la inversa, la región transcrita completa de IL-4 se vuelve desmetilada en condiciones que inducen Th2, lo que se correlaciona mucho con una transcripción eficaz de IL-4. En los linfocitos Th1, no se produce esta exhaustiva desmetilación, más bien, regiones no transcritas en particular se vuelven gradualmente muy metiladas y el IL-4 no se expresa (Lee y col., Immunity 16:649-660, 2002). Adicionalmente, Bruniquel y Schwartz (Nat Immunol. 4:235-40, 2003) han demostrado que en los linfocitos T intactos, el promotor de IL-2 está muy metilado e inactivo, pero después de la activación del linfocito T intacto, el gen IL-2 se somete a una desmetilación rápida y específica en seis CpG consecutivos. Esta alteración en los patrones de metilación se produce de forma simultánea con la diferenciación celular y producción aumentada del producto IL-2.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento mejorado del análisis de expresión y en particular el análisis de expresión basado en análisis de metilación de ADN del gen de la proteína CCR6 como una herramienta superior que puede complementar o reemplazar las metodologías convencionales como un indicador del tipo y estado celular en vertebrados, para identificar de forma fiable determinadas células inmunes, preferentemente linfocitos T y/o linfocitos B, de un mamífero y/o en un mamífero, en particular, ara la detección y garantía de calidad y control de los mismos.

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la misma, la presente invención resuelve el anterior objeto proporcionando un procedimiento para la identificación de células inmunes de un mamífero, que comprende el análisis del estado de metilación de al menos una posición CpG en el gen *ccr6*, en el que una desmetilación, cuando se compara con un linfocito T no activado es indicativo de una célula seleccionada a partir de linfocitos T activados estables, células NK, linfocitos T de memoria, en particular linfocitos T de memoria CD4+ o CD8+ y linfocitos T citotóxicos de memoria en dicho mamífero.

Se encontró de forma sorprendente que la desmetilación de CCR6 es indicativo de una activación estable de linfocitos T. Tal como se conoce en la técnica los linfocitos T desempeñan un papel central en la inmunidad mediada por células y puede distinguirse de otros tipos de linfocitos, tales como linfocitos B y linfocitos citolíticos naturales por la presencia de un receptor especial sobre su superficie celular denominado receptor de linfocito T (RLT). El término "activación" también es conocido para el experto en la materia, y la activación de linfocitos T CD4+ se produce mediante el acoplamiento de tanto el receptor de linfocito T como el CD28 sobre el linfocito T mediante el péptido complejo de mayor histocompatibilidad y los miembros de la familia B7 sobre la CPA (célula presentadora de antígeno), respectivamente. los linfocitos T citotóxicos destruyen las células infectadas por virus y células tumorales y también están implicados en el rechazo de trasplantes. Estas células también conocidas como linfocitos T CD8+ ya que expresan la glicoproteína CD8 en su superficie. La activación de linfocitos T citotóxicos depende de varias interacciones simultáneas entr moléculas expresadas sobre la superficie del linfocito T y las moléculas sobre la superficie de la CPA.

Una activación "estable" en contraste con una activación "transitoria" significa que las células inmunes mantienen su fenotipo, y en particular la expresión de CCR6 sobre un período de tiempo prolongado, tal como se ha desmostrado recientemente por los presentes inventores para el factor de transcripción Treg-específico FOXP3 (Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? Nat Rev Immunol. 2009; 9:83-89).

El procedimiento de acuerdo con la presente invención puede llevarse a cabo *in vitro*. Es preferente un procedimiento de acuerdo con la invención, en el que una desmetilación, cuando se compara con un linfocito T no activado es indicativo de una célula seleccionada a partir de linfocitos T de memoria, en particular, linfocitos T de memoria CD4+ o CD8+, linfocitos T de memoria citotóxicos, linfocitos B intactos y linfocitos de memoria.

55 Es preferente adicionalmente un procedimiento de acuerdo con la invención, en el que dichas células inmunes positivas de CCR6, preferentemente, linfocitos T de memoria, linfocitos T de memoria citotóxicos, linfocitos B intactos o linfocitos B de memoria son células inmunes positivas de CCR6 estables, preferentemente, linfocitos T de memoria estables, en particular, linfocitos T de memoria CD4+ o CD8+, linfocitos T de memoria citotóxicos, linfocitos B intactos y linfocitos B de memoria y linfocitos T reguladores CD25^{alto}CD4+. El análisis de la accesibilidad del locus

CCR6 proporciona información adicional, además de la mera expresión de CCR6, hasta el punto en que se ha producido una conversión en, por ejemplo, linaje de linfocitos T de memoria.

Es incluso más preferente un procedimiento de acuerdo con la invención, en el que una desmetilación en el gen *ccr6* es indicativo de una célula seleccionada a partir de linfocitos T CCR6⁺ CD4⁺ o CCR6⁺ CD8⁺, en particular de linfocitos T CCR6⁺ CD4⁺ o CCR6⁺ CD8⁺ T activados de forma estable y en los que dicho procedimiento comprende adicionalmente de forma opcional la etapa de aislamiento de linfocitos CD3⁺.

Si la expresión de CCR6 estable sobre linfocitos T humanos está controlada por mecanismos epigenéticos no se ha estudiado hasta el momento. En general, la regulación transcripcional de CCR6 no se entiende bien; un región con actividad de promotores se ha identificado en el gen CCR6 de ratón (Kucharzik T, Hudson JT, 3^a, Waikel RL, Martin WD, Williams IR. La expresión de CCR6 distingue mieloides de ratón y subconjuntos celulares dentríticos linfáticos: demostración usando una inserción de CCR6 EGFP de ratón. Eur J Immunol. 2002;32:104-112), y sobreexpresión del factor de transcripción ROR γ t, el regulador maestro de linfocitos Th17, lleva a la expresión de CCR6 sobre los linfocitos T humanos y murinos (Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, y col. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. J Exp Med. 2007; 204:2803-2812. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR-gamma-t. Nat Immunol. 2008;9:641-649). Los inventores han investigado, por lo tanto, si los mecanismos epigenéticos incluyendo la metilación de ADN del locus CCR6 contribuye a la regulación de la expresión de CCR6 estable en linfocitos T humanos. Los inventores podrían identificar una región no codificante en el gen CCR6, acoger la actividad transcripcional en linfocitos T primarios y ser metilada diferencialmente en linfocitos T CCR6⁻ y CCR6⁺ humanos. Estas observaciones y el efecto inductor del inhibidor de metilación de ADN de 5'-azacitidina sugiere que los mecanismos epigenéticos están implicados en la regulación de la expresión de CCR6 estable y la impronta de diferentes propiedades de direccionamiento en células inmunes humanas, en particular linfocitos T de memoria positivos CCR6. Puesto que una población celular se informó que estaba involucrada en la artritis reumatoide, la fracción positiva de IL17 ha demostrado ser CCR6 positiva, este marcado es de particular valor diagnóstico (véase a continuación). Son preferentes las aplicaciones en las que se realiza un ensayo de metilación completamente cuantitativo que mide la desmetilación de este marcado.

Los inventores han identificado detalles de la región dentro del gen CCR6, que están involucrados funcionalmente en la regulación de la expresión de CCR6 en células inmunes. Esta región contiene muchos motivos CpG, que muestran un estado de metilación diferencial cuando las células que expresan CCR6, preferentemente, células NK, linfocitos T de memoria, linfocitos T de memoria citotóxicos, linfocitos B intactos y linfocitos B de memoria, se comparan con células que no expresan CCR6, si, por ejemplo, se usa el procedimiento de secuenciación de bisulfitos. Los inventores pudieron demostrar que en los linfocitos CCR6⁻ los motivos CpG del gen CCR6 están casi completamente metilados (es decir, hasta más del 70 %, preferentemente 80 %, preferentemente, más del 90 % y lo más preferente más del 95 %), respectivamente, mientras que los mismos motivos están completamente desmetilados en, por ejemplo, los linfocitos T CCR6⁺.

La metilación diferencial de los motivos CpG dentro de la región anteriormente mencionada se correlaciona firmemente con la expresión de CCR6. Por lo tanto, la determinación del estado de metilación del locus CCR6 es una valiosa herramienta para la identificación de poblaciones estables de células inmunes selectivas requeridas para la aplicación clínica en el tratamiento de artritis reumatoide, enfermedad autoinmunitaria, rechazo o alergia a trasplante.

El CCR6 se ha descrito como un marcador para células inmunes activadas, como su expresión gnéica se observa en dichas células, tanto cuando se realiza en análisis con transcripciones de ARNm y como cuando se realiza con anticuerpos frente a la proteína. Estos medios de identificación, incluso entre el más plano de estos accesos y su superficie correspondiente de acoplamiento o de contacto, únicamente reconocen células activadas *actualmente* (y, por lo tanto, también de forma transitoria). Los sistemas de ensayo no son capaces de distinguir linfocitos T activados de forma estables de aquellos que solo reciben un estímulo pero pierden el fenotipo funcional poco después de que se haya proporcionado este impulso. El primer grupo constituye aquellos linfocitos que expresan de forma permanente CCR6 y, por lo tanto, constituyen el compartimento activado. Solo un análisis del patrón de metilación de linfocitos permite la distinción entre las dos clases/subgrupos, puesto que solo los linfocitos activados a medio/largo plazo, que expresan CCR6 son desmetilados. Por lo tanto, en efecto solo el análisis de metilación identifica linfocitos CCR6⁺ estables que constituyen la verdadera respuesta inmune y exhibidos por función mediante linfocitos activados CCR6⁺.

Para una identificación positiva de linfocitos T activados, un pre-aislamiento (por ejemplo, purificación usando, por ejemplo, clasificación celular) de células positivas CD3 puede ser necesario, puesto que para este escenario todos los linfocitos B son permanentemente CCR6⁺ y, por lo tanto, constituyen un "ruido" de fondo. Sin embargo, dentro del compartimento de linfocitos T, solo los linfocitos CCR6 desmetilados pueden considerarse completa y establemente activados. Mientras que en el cultivo celular pueden identificarse linfocitos CCR6⁺ permanentemente activados (usando FACS, MAC y ARNm) en una forma de cultivo aislada, esto no puede conseguirse en una muestra de sangre o una fracción que contiene linfocitos T de la misma, puesto que la medición identifica linfocitos positivos CCR6 en un punto de tiempo única y, por lo tanto, células activadas de forma estable y activadas de forma transitoria. No se conoce actualmente un marcador para la distinción en la sangre. Sorprendentemente, los presente

marcadores de metilación pueden conseguir una distinción ya que la proteína de CCR6 transitoria que produce células permanece metilada, mientras que los equivalentes positivos CCR6 permanentemente (estables) están desmetilados.

5 Es preferente un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que dicho estado de metilación de al menos una posición CpG en el gen *CCR6* se selecciona a partir de una metilación aumentada para el gen *CCR6* en granulocitos, monocitos, linfocitos T intactos y los linfocitos T citotóxicos intactos cuando se comparan con una posición CpG respectiva en células NK, linfocitos T de memoria, linfocitos T de memoria citotóxicos, linfocitos B intactos y/o linfocitos B de memoria.

10 En el contexto de la presente invención, el término "gen" significará una región del ADN cromosómico que codifica una determinada proteína, tal como CCR6, y que contiene otros elementos genéticos que son responsable de la regulación de dicho gen, tal como, por ejemplo, la región que solapa la región del promotor del gen *CCR6* de acuerdo con la SEQ ID NO 13. Por lo tanto, un gen también incluye intrones, potenciadores, secuencias de los promotores y la región no traducida 5' del gen. En este caso, el gen no solo incluirá la secuencia como se proporciona en los número de referencia tal como se indica en el presente documento, sino que también incluirá las regiones no traducidas aguas arriba y aguas abajo del mismo.

15 Algunos análisis tal como se han realizado para la presente invención se han llevado a cabo en el sistema murino. Sin embargo, las regiones que muestran metilación diferencial de los motivos CpG entre los linfocitos CCR6⁻ y CCR6⁺ se conservan muy bien entre mamíferos, en particular entre ratones y humanos. Además, los experimentos muestran que en el sistema humano los mismos y/u homólogos motivos CpG son dimetilados como en las células CCR6 murinas. En el contexto de la presente invención, este hecho se describe mediante los términos gen "ortólogo" o "parálogo". Un "ortólogo" es un gen en dos o más especie que ha evolucionado a partir de un ancestro común y también se denomina un gen ortólogo. En el contexto de la presente invención, *Homo sapiens CCR6* es, por lo tanto, un ortólogo del gen y/o proteína *CCR6 Mus musculus*. "Parálogos" son genes relacionados por duplicación dentro de un genoma y también se denomina gen parálogo. Los ortólogos retienen la misma función en el transcurso de su evolución, mientras que los parálogos desarrollan nuevas funciones, incluso si estas están relacionadas con las originales. Incluido en el término "parálogo" se encuentra un "pseudogen" que es una secuencia nucleótida 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 una ARN.

20 Basándose en la información tal como se proporciona en el presente documento, el experto en la técnica será fácilmente capaz de, comparar los genes ortólogos o parálogos (por ejemplo, usando un programa informático para alinear las secuencias, tal como el programa ClustalW), y de identificar regiones y/o posiciones CpG que pueden encontrarse en las mismas regiones y/o incluso en las mismas posiciones equivalentes en el (ambos) gen(es). Estas regiones y/o posiciones CpG se consideran como ortólogos o parálogos. Normalmente, una alineación se basa en el nivel de identidad secuencial entre los dos (o más) fragmentos de ADN que se analizan. Los niveles de identidad secuencial son preferentemente aproximadamente el 75 %, más preferentemente aproximadamente el 80 % y lo más preferente aproximadamente el 90 % de un fragmento dado.

25 Con el fin de analizar el estado de metilación de las posiciones CpG, puede usarse cualquier procedimiento conocido para analizar la metilación de ADN. En una realización preferente del procedimiento según la invención, el análisis del estado de metilación comprende un procedimiento seleccionado a partir de productos de digestión enzimática específicos de metilación, secuenciación de bisulfitos, análisis seleccionado a partir de metilación de promotores, metilación de islas de CpG, MSP, HeavyMethyl, MethyLight, Ms-SNuPE u otros procedimientos que se basando en una detección ampliada de ADN. Estos procedimientos son bien conocidos para el experto en la técnica y pueden encontrarse en la literatura respectiva. Adicionalmente, también pueden usarse muestras agrupadas (por ejemplo, de 5 muestras o más), normalmente, un grupo de muestras se analiza para el estado de metilación de al menos una posición CpG.

30 En una realización preferente del procedimiento según la invención, dicho análisis del estado de metilación del gen CCR6 comprende la amplificación con al menos uno de los pares de cebadores seleccionados a partir de la SEQ ID No. 1 y 2 ("amplicon 888"); SEQ ID No. 3 y 4 ("amplicon 1201"); SEQ ID No. 5 y 6 ("amplicon 1202"); SEQ ID No. 7 y 8 ("amplicon 1203") y SEQ ID No. 11 y 12 ("RDM"), y pares de cebadores ortólogos o parálogos de los mismos, y preferentemente dicho análisis del estado de metilación comprende la aplicación con al menos uno de los pares de cebadores seleccionado a partir de la SEQ ID No. 5 y 6; SEQ ID No. 7 y 8; SEQ ID No. 11 y 12; y pares de cebadores ortólogos o parálogos de los mismos.

35 Preferentemente, la amplificación implica una enzima de polimerasa, una RCP o una reacción de amplificación química, u otros procedimientos de amplificación tal como conoce un experto en la técnica y se describe a continuación, por ejemplo, en el contexto de MSP, HeavyMethyl o MethyLight. En otra aspecto de la presente invención, oligómeros según cualquiera de la f SEQ ID No. 1 a 12 o un amplicon (por ejemplo, según la SEQ ID No. 13) tal como amplificado por un par de cebadores seleccionado a partir de la SEQ ID No. 1 y 2, SEQ ID No. 3 y 4, SEQ ID No. 5 y 6 y SEQ ID No. 7 y 8, y SEQ ID No. 11 y 12 u oligómeros ortólogos o parálogos o amplicones constituyen realizaciones preferentes de la presente invención.

- Basándose en la anterior información y los datos tal como se han obtenido a partir del sistema murino, pueden designarse pares de cebadores ortólogos o parálogos por un experto en la técnica que tienen una identificación secuencial con los cebadores anteriores de preferentemente el 75 %, más preferentemente aproximadamente el 80 % y lo más preferente aproximadamente el 90 %. Es particularmente preferente un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que dicho análisis del estado de metilación comprende la amplificación con al menos uno de los pares de cebadores seleccionados a partir de la SEQ ID No. 5 y 6; SEQ ID No. 7 y 8; SEQ ID No. 11 y 12; y pares de cebadores ortólogos o parálogos de los mismos.
- Es preferente adicionalmente un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que el análisis del estado de metilación comprende el análisis del estado de metilación de al menos una posición CpG seleccionada a partir del grupo que consiste en posiciones de nucleótidas 71, 98, 106, 135 178, 193, 277, 316, y 339 del amplicón según amplificado por el par de cebadores SEQ ID No. 1 y 2, posiciones 23, 36, 38, 53 y 114 del amplicón según amplificado por el par de cebadores de SEQ ID No. 3 y 4, posiciones 23, 109, 161, 193, 217 y 245 del amplicón según amplificado por el par de cebadores de SEQ ID No. 5 y 6, posiciones 62, 101, 124, 202, 246 y 251 del amplicón según amplificado por el par de cebadores de SEQ ID No. 7 y 8, posiciones 71,98, 106, 135, 178, 193, 277 y 316 del amplicón según amplificado por el par de cebadores de SEQ ID No. 11 y 12 y posiciones CpG de ortólogos o parálogos de los mismos.
- El experto en la técnica será además capaz de seleccionar subconjuntos específicos de posiciones CpG para minimizar la cantidad de sitios a analizar, por ejemplos, todos los sitios según presentes en el amplicon 888 o la RDM o posiciones ortólogas o parálogas del mismo.
- El procedimiento según la presente invención puede llevarse a cabo con cualquier mamífero que tenga el gen *CCR6*, es preferente un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que dicho mamífero es un ratón, de rata, mono o humano.
- En otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un procedimiento para diagnosticar el estado inmune de un mamífero, que comprende las etapas de a) proporcionar una muestra que contiene células inmunes de dicho mamífero a diagnosticar, b) analizar el estado de metilación de al menos una posición CpG en el gen *CCR6* de acuerdo con la presente invención en dichas células inmunes, c) identificar la cantidad y/o tipo de células inmunes presentes en dicha muestra basándose en dicho estado de metilación y d) pronunciarse sobre el estado inmune de dicho mamífero basándose en dicha cantidad y/o tipo tal como se ha identificado.
- En un aspecto de este procedimiento, la población total de linfocitos T en una muestra (que contiene distintos tipos de células inmune) se analiza para conocer su estado de metilación en el gen *CCR6*. Basándose en el resultado de la frecuencia de metilación total de los sitios, puede determinarse la relación y/o cantidad de, por ejemplo, linfocitos T de memoria dentro de la población analizada. A partir de dicho resultado, se puede pronunciar sobre el estado inmune y/o estado de linfocitos T del mamífero tal como se ha diagnosticado. El procedimiento puede llevarse a cabo *in vitro*. En general, pueden usarse todas las muestras biológicas, siempre y cuando contengas linfocitos T adecuados. Es preferente un procedimiento, en el que dicha muestra se selecciona a partir de una muestra sanguínea, una muestra de sangre de linfocitos o una fracción de la misma. De forma más preferente, una muestra comprende linfocitos T purificados mediante CD3, usando preferentemente la clasificación celular o perlas magnéticas (MACS). Este procedimiento también puede usarse para producir linfocitos B que contienen muestras para el análisis.
- El procedimiento según la presente invención puede llevarse a cabo con cualquier mamífero que tenga el gen *ccr6*, es preferente un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que dicho mamífero es un ratón, de rata, mono o humano. Es preferente un procedimiento, en el que dicho mamífero es un paciente que padece una enfermedad seleccionada a partir de enfermedades autoinmunitarias, efectos adversos en enfermedades autoinmunitarias, efectos adversos en receptores de alotransplantes, enfermedades tumorales, cáncer de ovario, enfermedad de injerto contra hospedador, asma alérgica, esclerosis múltiple, se observaron también inflamaciones, articulaciones inflamadas, artritis reumatoide, enfermedad psoriásica, enfermedad inflamatoria intestinal, encefalopatía y síndrome de inmunodesregulación - poliendocrinopatía - enteropatía ligada a X (IPEX). Preferentemente, dicha enfermedad es artritis reumatoide. Estas enfermedades y sus relaciones con las células inmunes se han descrito en la literatura respectiva.
- Es incluso más preferente un procedimiento que comprende adicionalmente la medición y/o control de la cantidad y/o relación de dichas células inmunes en respuesta a sustancias químicas y/o biológicas que modulan la expresión de *CCR6* en la célula inmune. Es decir, cambios en la cantidad o relación de células inmunes que son causados por, por ejemplo, el tratamiento de una enfermedad (por ejemplo, tal como se describe en el presente documento) y el éxito y/o progreso de dicho tratamiento en término de un efecto sobre las células inmunes puede seguirse usando este procedimiento. Un seguimiento del patrón de metilación de inmunes basándose en el marcador del presente documento apuntará cambios en las células que se debe a la respuesta a dichas sustancias químicas y/o biológicas, en algunos casos, incluso antes de que se observe un cambio fenotípico. Esta información puede usarse posteriormente para ajustar terapias frente las enfermedades subyacentes o relacionadas (como, por ejemplo, las mencionadas en el presente documento) y, por lo tanto, permitir un tratamiento y/o prevención mejorado y más eficaz, que incluye evitar y/o reducir los efectos secundarios.

En otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar idoneidad de células inmunes generadas *in vitro* o expandidas para una transferencia en un paciente, que comprende el procedimiento de acuerdo con la invención y detectar, si las posiciones CpG tal como se han analizado se han metilado hasta al menos el 80 %, preferentemente el 90 % y más preferentemente el 95 %. El procedimiento puede llevarse a cabo *in vitro* y/o *in vivo*. Por ejemplo, las células inmunes que parecen mostrar una expresión de CCR6 modificada, en particular una gota, no se consideran estables y no se usarán más.

En otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar sustancias químicas y/o biológicas que modulan la expresión de CCR6 en una célula inmune, que comprende entrar en contacto una o más de dichas sustancias químicas y/o biológicas con una célula inmune, realizar el procedimiento de acuerdo con la invención tal como se describe en el presente documento y detectar, si dicha sustancia química y/o biológica modula la metilación de las posiciones CpG tal como se ha analizado. El procedimiento puede llevarse a cabo *in vitro* y/o *in vivo*. En este aspecto, la presente invención abarca un procedimiento, a veces denominado "procedimiento de cribado", que busca identificar sustancias químicas y/o biológicas que modulan la expresión de CCR6 que puede usarse como puntos de inicio para el desarrollo de la medicación específica de linfocitos T reguladores y composiciones farmacéuticas correspondientes. Es presente procedimiento se basa en que está bien aceptado que el gen CCR6 y/o BLR1 desempeña un papel central en el desarrollo de células inmunes tal como se describe en el presente documento, tales como células NK, linfocitos T de memoria, linfocitos T de memoria citotóxicos, linfocitos B intactos y linfocitos B de memoria. Por lo tanto, los factores que modulan la expresión de CCR6 también son herramientas interesantes para tratar enfermedades autoinmunitarias o receptores de alotransplantes. Incluso factores que previenen la expresión de CCR6 y/o BLR1 son interesantes para el tratamiento de pacientes tumorales, en los que las células inmunes CCR6⁺, preferentemente, células NK, linfocitos T de memoria, linfocitos T de memoria citotóxicos, linfocitos B intactos y linfocitos B de memoria han demostrado prevenir una respuesta anti-tumoral fuerte. Tales factores que conducen a una modificación estable de la expresión de CCR6, pueden detectarse con el procedimiento descrito en la presente invención. Adicionalmente, los factores que pueden potenciar la diferenciación de células inmunes y conducir a un alivio de enfermedades autoinmunitarias y alérgicas pueden identificarse con el presente procedimiento. Las sustancias químicas y/o biológicas que son adecuadas como compuestos de criba son conocidas para el experto en la técnica y, por ejemplo, incluyen pequeñas moléculas, péptidos y proteínas, y anticuerpos o fragmentos de los mismos. Adicionalmente, la criba puede realizarse usando una biblioteca de compuestos disponible en el mercado, opcionalmente junto con una automatización adecuada, tal como un robot. En una realización preferente del procedimiento para identificar sustancias químicas y/o biológicas, dicha sustancia proporciona una desmetilación de las posiciones CpG tal como se ha analizado hasta al menos el 80 %, preferentemente el 90 % y más preferentemente el 95 %.

Se desvela un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades que están asociadas con la expresión aberrante del gen CCR6, que comprende el procedimiento de acuerdo con la invención tal como se describe en el presente documento y detectar, si las posiciones CpG tal como se han analizado se han desmetilado hasta al menos el 80 %, preferentemente el 90 % y más preferentemente el 95 %, en las que las enfermedades se seleccionan a partir de enfermedades autoinmunitarias, efectos adversos en receptores de alotransplantes, enfermedades tumorales, cáncer de ovario, enfermedad de injerto contra hospedador, asma alérgica y síndrome IPEX. El presente procedimiento puede llevarse a cabo *in vitro* y/o *in vivo*.

Otro aspecto preferente de la presente invención se refiere a un kit para identificar linfocitos T activados, preferentemente linfocitos T o linfocitos T de memoria, basándose en el análisis del estado de metilación de las posiciones CpG en el gen CCR6, que comprende a) un reactivo de bisulfitos y b) al menos uno de los pares de cebadores seleccionados a partir de la SEQ ID No. 1 y 2; SEQ ID No. 3 y 4; SEQ ID No. 5 y 6; SEQ ID No. 7 y 8, y SEQ ID No. 11 y 12, y pares de cebadores ortólogos o parálogos de los mismos. El experto en la técnica será además capaz de seleccionar materiales para subconjuntos específicos de posiciones CpG para minimizar la cantidad de sitios a analizar, por ejemplo, todos los sitios según presentes en el amplicon 888 y/o todos los sitios tal como se encuentran presentes en el amplicon de acuerdo con la SEQ ID No. 13 (RDM), o posiciones ortólogas o parálogas del mismo. El kit puede ser un kit de diagnóstico.

Los kits de acuerdo con la presente invención pueden contener preferentemente también: 1. Productos químicos (bisulfito, etc) para el procesar las muestras celulares; 2. Protocolos de procedimiento; 3. sondas oligonucleótidas, amplicones, bloqueadores o cebadores de extensión de acuerdo con la presente invención que detectarán los marcadores relevantes a un tipo celular particular. Los oligonucleótidos estarían contruidos para generar una señal sobre una plataforma de detección comúnmente disponible, tal como RCP en tiempo real (RCP-TR) o extensión de base única (SBE). Cada señal indica el nivel de metilación en un sitio diana particular en la muestra. Como una alternativa, las sondas de acuerdo con los ácidos nucleicos descritos podrán producirse para su uso sobre un chip; 4. Una herramienta bioinformática para procesar los resultados. Esto, por ejemplo, el software podría normalizar las señales a partir de los datos sin procesar, contener una matriz de resultados para la interpretación de la lectura o implementar diversos algoritmos que calculan, por ejemplo, las proporciones del tipo celular o predicciones de potencia.

Aún otro aspecto preferente de la presente invención se refiere al uso de un oligómero o amplicon de acuerdo con la presente invención o un kit de acuerdo con la presente invención para detectar y/o identificar linfocitos T,

preferentemente linfocitos T activados estables, en analogía a lo que se ha descrito anteriormente.

Se desvela un procedimiento de tratamiento de enfermedades que están relacionadas con la expresión de CCR6, enfermedades autoinmunitarias, efectos adversos en receptores de alotransplantes, enfermedades tumorales, cáncer de ovario, enfermedad de injerto contra hospedador, asma alérgica, esclerosis múltiple, se observaron también inflamaciones, articulaciones inflamadas, artritis reumatoide, enfermedad psoriásica, enfermedad inflamatoria intestinal, encefalopatía y síndrome de inmunodesregulación - poliendocrinopatía - enteropatía ligada a X (IPEX), preferentemente artritis reumatoide, enfermedad psoriásica, enfermedad inflamatoria intestinal, lo más preferentemente artritis reumatoide. El procedimiento comprende la administración de una cantidad eficaz de células inmunes tal como se ha caracterizado de acuerdo con la presente invención usando expresión de CCR6 a dicho paciente que lo necesita. Cómo administrar cantidades eficaces de células inmunes, se describe en la literatura (por ejemplo, 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 de enero de 2006; Khazaie K, von Boehmer H. The impact of CD4(+)CD25(+) Treg on tumor specific CD8(+) T cell cytotoxicity and cancer. *Semin Cancer Biol.* Abril de 2006;16(2):124-136. Epub 26 de enero de 2006 y las referencias tal como se citan en el presente documento), y el experto será capaz de aplicar estos procedimientos en el contexto de la presente invención. El término "tratamiento" también incluye una prevención de dichas enfermedades relacionadas con la expresión CCR6 y/o BLR1.

El análisis del estado de metilación de la región dentro del locus CCR6 permite una predicción mejorada de si la población celular expresará de forma estable el gen CCR6 o no. Por lo tanto, este procedimiento puede usarse como un control de calidad para células inmunes generadas *in vitro* o expandidas antes de la transferencia adoptiva en pacientes que padecen enfermedades autoinmunitarias o que han recibido un alotransplante. Solo si los motivos CpG están desmetilados hasta un determinado grado resulta seguro que están células expresarán de forma estable el gen CCR6 y no perderán la expresión CCR6 después de algún período de tiempo. Tal "control de calidad" relativo a la estabilidad del fenotipo regulador de células adoptivamente transferidas se requiere de forma absoluta y puede conseguirse solo mediante el análisis del estado de metilación de la(s) región(es) anteriormente mencionadas del locus CCR6.

En una realización de la presente invención y tal como se describe en el presente documento, el estado de metilación del locus CCR6 se analizó mediante secuenciación de bisulfitos y reveló diferencias llamativas entre granulocitos, monocitos, linfocitos T intactos o linfocitos T citotóxicos intactos y células NK, linfocitos T de memoria, linfocitos de memoria citotóxicos, linfocitos B intactos y linfocitos B de memoria. Para el CCR6, el amplicon 888 y el amplicon 1203 (véanse ejemplos) mostraron un alto grado de metilación (cerca del 100 %) dentro de los granulocitos convencionales, monocitos, linfocitos T intactos o linfocitos T citotóxicos intactos (Figura 8A, 8B y 9). Amplicon 1204 (SEQ ID NO 26; véanse ejemplos) mostraron un alto grado de metilación (cerca del 100 %) dentro de los linfocitos T intactos convencionales y linfocitos T citotóxicos intactos. En los amplicones 1201 y 1202 (véanse ejemplos), el procedimiento de desmetilación se produce solo en linfocitos B intactos y linfocitos de memoria, que muestran que la desmetilación no es un caso al azar, sino que confinado a regiones definidas. En particular, se identificó una región en el locus CCR6 (véase SEQ ID No. 13), que mostró un alto grado de desmetilación (cerca del 100 %) dentro de los linfocitos T de memoria CCR6⁺ CD4⁺ y CD8⁺.

La expresión diferencial de diferentes receptores de quimiocinas sobre células inmunes asegura una distribución temporal-espacial coordinada de diversos conjuntos funcionales y de etapas de diferenciación del efector y células reguladoras a y dentro de tejidos linfoides y no linfoides. Algunos de los fenotipos migratorios, especialmente sobre linfocitos T y B, se vuelven aparentemente de forma permanente improntados cuando se realiza la diferenciación y permite un suministro selectivo de poblaciones de memoria a compartimentos específicos del organismo ("direccionamiento"). Cómo se adquieren y mantienen fenotipos de direccionamiento estables en la descendencia de linfocitos T y B no se comprende bien. Los mecanismos epigenéticos, a saber, la metilación/desmetilación de regiones de ADN tal como se describe en el presente documento implicados en la regulación transcripcional, son idealmente adecuados para proporcionar una memoria a largo plazo de cambios de fenotipos debido a la impronta de distintivos de metilación "heredable". En el contexto de la presente invención, los investigadores, de este modo, investigaron si la metilación de ADN diferencial debería estar implicada en la adquisición de expresión de CCR6 estable en linfocitos T humanos primarios.

En el contexto de la presente invención, de forma sorprendente se identificó inicialmente una región (SEQ ID No. 13, RDM) dentro del locus CCR6 estando diferencialmente metilada entre subpoblaciones de leucocitos mediante un enfoque de DMH (Baron U, Floess S, Wiczorek G, y col. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. *Eur J Immunol.* 2007; 37:2378-2389) y se verificó mediante análisis del estado de metilación de subconjuntos de glóbulos sanguíneos humanos clasificados usando la conversión de bisulfitos. El patrón de metilación observado coincide en gran parte con la expresión de CCR6 en diversos subconjuntos de linfocitos, en las que las células que expresan CCR6 tales como linfocitos T CD56⁺ NK y NKT, algunos linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, linfocitos B maduros y Treg CD4⁺ mostraron una región de CCR6 parcialmente o incluso completamente desmetilada, mientras que el locus se metiló completamente en los monocitos CD14⁺ en reposo y los granulocitos CD15⁺ que carecían de la expresión de CCR6.

Sin embargo, entre los linfocitos T de memoria CD4⁺ y CD8⁺, la desmetilación de la región de CCR6 queda reducida

a los subconjuntos que expresan la proteína CCR6 sobre su superficie, sugiriendo un papel para este elemento genético y su estado de metilación en la regulación de *CCR6*.

La desmetilación de ADN se ve normalmente como un distintivo para un patrón de expresión estable, heredable, según los inventores pudieron demostrar recientemente para el factor de transcripción Treg-específico FOXP3 (Huhnen, J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol.* 2009; 9:83-89).

Al igual que muchos otros receptores de quimiocinas inflamatorias, el CCR6 se expresa sobre una gran parte de linfocitos T de memoria circulantes, pero carece de linfocitos T intactos (Liao F, Rabin RL, Smith CS, Sharma G, Nutman TB, Farber JM. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *J Immunol.* 1999; 162:186-194.; Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, y col. Chemokine receptor expressions and responsiveness of cord blood T cells. *J Immunol.* 2001;166:1659-1666), sugiriendo que la expresión de CCR6 se adquiere durante la impronta de linfocitos T. La expresión de CCR6 puede inducirse *de novo* a partir de linfocitos T CCR6⁺CD4⁺ intactos usando un cóctel de citoquinas que contiene IL-1, IL-6, TGF- β y TNF- α (Acosta-Rodríguez EV, Rivino L, Geginat J, y col. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007; 8:639-646; Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, y col. Chemokine receptor expressions and responsiveness of cord blood T cells. *J Immunol.* 2001;166:1659-1666).

Aunque el porcentaje de linfocitos CCR6⁺ se ve aumentado con estimulaciones repetitivas en condiciones inductoras, la expresión de *CCR6* que se consigue no se encontró ser estable en un cultivo prolongado, contrastando con los linfocitos T de memoria clasificados *ex vivo* de CCR6⁺, ni se asoció con una desmetilación de la región de *CCR6*, lo que demostró ser característico para la población de memoria de CCR6⁺. El estado de metilación en los linfocitos de memoria podría ser independiente del fenotipo funcional, ya que los inventores ven la desmetilación de la región de *CCR6* en linfocitos de CCR6⁺ que secretan y que no secretan IL-17. Conjuntamente, los datos tal como se proporcionan por la presente invención sugieren que las señales específicas, hasta el momento desconocidas, son necesarias para imprimir un perfil de expresión de *CCR6* estable en linfocitos T CD4⁺.

Finalmente, una falta de correlación entre la metilación de ADN y la expresión real de *CCR6* se encontró para la regulación de *CCR6* sobre linfocitos T de memoria CD4⁺ siguiendo la simulación RLT: la pérdida transitoria de la expresión de *CCR6* no se vio acompañada por un cambio en el patrón de metilación. Aquí de nuevo, el cambio en la expresión no fue estable ya que el *CCR6* se reexpresó rápidamente después de la retirada del estímulo de RLT y la adición de IL-2. Para este caso, incluso entre el más plano de estos accesos y su superficie correspondiente de acoplamiento o de contacto, No puede excluirse que la regulación de *CCR6* se debió a la modulación del receptor más que a la regulación transcripcional de la expresión de *CCR6*. Estos datos muestran que la metilación de ADN en una región crítica del locus *CCR6* está implicada en la adquisición de un fenotipo que expresa *CCR6* de forma permanente en linfocitos T de memoria.

El resultado de que el estado de metilación de elementos génicos reguladores en el locus *CCR6* dicta la estabilidad a largo plazo de la expresión de *CCR6* se corroboró adicionalmente mediante experimentos que implicaban la hipometilación de ADN artificial. La aplicación de el inhibidor de la metiltransferasa de ADN 5'-azacitidina durante la estimulación de linfocitos T no solo aumentó la expresión de *CCR6*, incluso en ausencia de citoquinas inductoras de *CCR6* exógenas, sino también resultó en células *CCR6*⁺ que mostraron una expresión de *CCR6* estable en la expansión *in vitro*, un descubrimiento que también se observó previamente para la expresión de Foxp3 en Treg inducidos *in vitro* (Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, y col. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol.* 2008; 38:1654-1663).

Aquí, los inventores identificaron y caracterizaron una región no codificante del locus *CCR6* humano, mostrando motivos CpG no metilados en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria que expresan *CCR6* y Treg CD25^{high}FOXP3⁺. La expresión de *CCR6* sobre linfocitos T CD4⁺ de memoria *CCR6*⁺ fue estable en la proliferación inducida por citoquinas y ligeramente se reguló con la estimulación RLT. Sin embargo, tal regulación de *CCR6* fue solo transitoria y no se vio acompañada por la re-metilación de la región reguladora dentro del locus *CCR6*. A la inversa, la inducción *in vitro* de la expresión *CCR6* en linfocitos T CD4⁺ intactos en la estimulación RLT en presencia de citoquinas inflamatorias resultó en una expresión de *CCR6* inestable y no mostró ningún cambio en el estado de metilación del locus *CCR6*. De manera notable, el tratamiento con el inhibidor de metilación de ADN 5'-azacitidina llevó a una expresión de *CCR6* aumentada y parcialmente estable. Cuando se clonó en un plásmido de gen indicador esta región diferencialmente metilada mostró una actividad transcripcional constitutiva cuando se realizó la transfección en linfocitos T primarios *CCR6*⁺ de aislados *ex vivo*, demostrando que podría actuar como un elemento potenciador para regular la expresión de *CCR6*.

En resumen, los inventores han identificado una región no codificante del gen *CCR6* humano que muestra actividad transcripcional constitutiva en linfocitos T *CCR6*⁺ que media la expresión de *CCR6* estable a través de mecanismos epigenéticos. La presente invención proporciona por primera vez pruebas experimentales que los mecanismos epigenéticos no están solo regulando la actividad transcripcional de un receptor de quimiocinas sino que además podrían desempeñar un papel fundamental en la impronta de un patrón de expresión permanente, dotando, de este modo, linfocitos T de memoria diferenciados con memoria topográfica y formando su comportamiento migratorio a

largo plazo.

La presente invención se describirá ahora en los siguientes ejemplos con referencia a las figuras adjuntas y listado de secuencias, sin embargo, sin limitarse a los mismos. En las figuras,

5 La Figura 1 muestra que la región no codificante preferente en el gen CCR6 muestra una metilación diferencial en CMSP. A) Localización de la región rica en CpG dentro del locus CCR6 humano. La estructura de exones de los transcritos de CCR6 putativos, obtenidos a partir de la base de datos Ensembl (GRCh37), se representaron junto con las regiones de promotor previstas (Genomatix) y la región diferencialmente metilada identificada en el locus CCR6. Las casillas sombreadas en gris en los transcritos de CCR6 representan regiones de exones no codificantes, mientras que las casillas negras contienen regiones codificantes. B) El patrón de metilación de ADN para CCR6 se analizó a partir de CMSP (cinco donantes) y se clasificó en CD4⁺CD45RA⁺ y CD4⁺CD25^{alto}. Cada columna representa un subconjunto de glóbulos sanguíneos con cada fila representando un único sitio de CpG. Se midió la metilación de ADN por medio de secuenciación de bisulfitos. Los niveles de metilación de CpG están codificados en color según la escala de la gama de colores de gris claro (0 % de metilación) a gris oscuro (100 % de metilación).

15 La Figura 2 muestra que la desmetilación de la región de CCR6 preferente se correlaciona con la expresión de CCR6 en linfocitos CD4 y CD8 humanos. A) Tinción de FACS representativa de CCR6 y CD45RA sobre linfocitos CD4⁺CD25⁻ y CD8⁺CD25⁻. B) Se aislaron linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ a partir de CMSP y se clasificaron en linfocitos de memoria CCR6⁻ y CCR6⁺ e intactos de CCR6 resultando en subconjuntos con una pureza de >95 %. Los análisis de metilación de subconjuntos clasificados se muestran con respecto a un donante representativo. Los gráficos a continuación muestran la media de metilación de sitios de CpG de cinco a seis donantes de linfocitos T CD4⁺ y tres donantes de linfocitos T CD8⁺, respectivamente.

20 La Figura 3 muestra que los linfocitos T CCR6⁺ expresan de forma estable CCR6 en la expansión *in vitro* y mantienen una región de CCR6 desmetilada. A) Se cultivaron linfocitos T de memoria CCR6⁺CD4⁺ marcados con CFSE durante seis días en un medio que contenía IL-7 e IL-15 recombinante humana (ambos 10 ng/ml) o Dynabeads® anti-CD3/anti-CD28 con y sin TGF-β y se analizaron para la expresión de CCR6. Se muestra un donante representativo de los cuatro. B) Se estimularon linfocitos T de memoria CCR6⁺CD4⁺ con Dynabeads® anti-CD3/anti-CD28 en condiciones neutras o con TGF-β (10 ng/ml). Después de seis días, se volvió a analizar la expresión de CCR6. Las curvas sombreadas en gris muestran el control de isotopos. C) Se evaluó el análisis de metilación de la región de CCR6 para las células CCR6⁺ cultivadas durante seis días como en B para dos donantes. D) Se estimularon células CCR6⁺ con Dynabeads® anti-CD3/anti-CD28 en condiciones neutras, se clasificaron el día 6 en células CCR6⁻ y CCR6⁺ y se cultivaron durante tres días adicionales en un medio que contenía IL-2 (1000 U/ml). Los datos son representativos para dos donantes.

25 La Figura 4 muestra que el CCR6 inducido *in vitro* es inestable y no conduce a la desmetilación de la región de CCR6 preferente. A) Se estimularon linfocitos T CD4⁺ intactos sin (barras blancas) o con citoquinas proinflamatorias y TGF-β (barras negras) durante cuatro días, seguido por un cultivo en IL-2 (1000 U/ml). Después de seis a siete días, se analizaron las células para la expresión de CCR6 (n=21, gráfico izquierdo). El perfil de metilación de los linfocitos T CD4⁺ cultivados con (+) y sin (-) cóctel de citoquinas se muestra en el gráfico derecho (n=2). B) Se clasificaron células estimuladas con el cóctel de citoquinas tal como en A en células CCR6⁺ y CCR6⁻ (mostrado para un donante representativo) y se analizaron para la metilación de la región de CCR6. C) Expresión de CCR6 (superior) y análisis de metilación (inferior) de la región de CCR6 después de la estimulación tal como se muestra en D (un donante representativo). D) Se cultivaron linfocitos T CD4⁺ intactos tal como en A y como se muestra en panel izquierdo para la expresión de CCR6 el día 7, 10 y 24 (n=4) o como se representa en el panel derecho re-estimulado después de seis a siete días con las mismas condiciones que en la primera estimulación y analizado para la expresión de CCR6 (n=11).

35 La Figura 5 muestra que la inhibición de metilación de ADN conduce a una expresión de CCR6 parcialmente estable. A) Se estimularon linfocitos T CD4⁺ T intactos sin (n=18, panel izquierdo) o con (n=6, panel derecho) citoquinas proinflamatorias y TGF-β. Después de 48 horas, se añadió Aza al medio durante otras 48 horas. La expresión de CCR6 se analizó el día 6. B) Se estimularon linfocitos T CD4⁺ intactos con Aza y sin citoquinas como en A. Después de seis días, las células se clasificaron de acuerdo con su expresión de CCR6 y se re-estimularon en condiciones neutras en ausencia de Aza durante cinco días adicionales seguido por el re-análisis de la expresión de CCR6. Los datos que se muestran son representativos para dos experimentos realizados de forma independiente.

40 La Figura 6 muestra que la región de CCR6 diferencialmente metilada de forma preferente abarca actividad transcripcional. Se transfectaron linfocitos T CD4⁺totales con plásmido promotor de pGL3, que contenía el promotor mínimo SV40 en frente del gen indicador de luciferasa o pGL3-CCR6, en la que la región de CCR6 se clonó en frente del promotor SV40. Después de la nucleofección, se cultivaron las células en un medio que contenía IL-2 (barras blancas) o se estimuló con PMA y Iomicina durante cuatro horas (barras grises). Las unidades de luz de luciferasa relativas se normalizaron a actividad de luciferasa renilla. Los valores para el plásmido promotor de pGL3 se establecieron a 1 para obtener la activación de x-veces. Las barras muestran la actividad de luciferasa media de las células a partir de distintos donantes, las líneas muestran el área de

distribución de los valos únicos.

La Figura 7 muestra la región desmetilada (RDM) CCR6 humana en el cromosoma 6, junto con los sitios de unión del factor tal como se ha previsto.

5 La Figura 8A muestra la metilación de posiciones CpG particulares en el promotor del gen CCR6 y BLR1 en distintos tipos de células de leucocitos (BCST18: granulocitos; BCST19: monocitos; BCST20: células NK; BCST21: linfocitos T intactos; BCST22: linfocitos T de memoria; BCST23: linfocitos T de memoria citotóxicos intactos; BCST24: linfocitos T de memoria citotóxicos; BCST25: linfocitos B intactos; BCST26: linfocitos B de memoria). Posiciones particulares en el amplicon se indican mediante el número que sigue el amplicon, es decir, AMP888:71 es la posición 71 en el amplicon 888. Empezando de CpG 178 en Amp 888 hasta CpG71 se puede observar una metilación estrictamente dependiente del tipo celular. Los linfocitos T intactos, a pesar de su estado de expresión de CD4 y CD8 muestran una metilación aumentada. En contraste con los linfocitos T de memoria clasificados de CCR6 se segregan en una fracción intermedia a completamente metilada, definida por la fracción que no expresa CCR6 y la fracción que expresa CCR6, que están al mismo tiempo completamente desmetilada en el locus medido. Puede encontrarse un alto grado de metilación en BLR1 (amplicon 1037) en granulocitos, monocitos, células NK, linfocitos T intactos, linfocitos T citotóxicos intactos y linfocitos T de memoria citotóxicos. La Figura 8B muestra la metilación de posiciones CpG particulares en el promotor del gen CCR6 en distintos tipos de células de leucocitos en distintos donantes. Puede observarse que el estado de metilación es independiente del donante.

20 La Figura 9 muestra el análisis de metilación del locus CCR6 en diversas posiciones distintas del gen CCR6. Esta comparación incluye diversos tipos celulares de leucocitos distintos de linfocitos T citotóxicos y colaboradores. Los datos muestran que la desmetilación de Amp 1201 solo se observa en linfocitos B de memoria intactos, mientras que todas las otras fracciones de leucocitos incluyendo granulocitos CD15+, monocitos CD14+ y células NK CD56+ y todas las fracciones de linfocitos T están completamente metiladas. En el amplicon 888, además de las fracciones de memoria de ambos linfocitos T CD4 y CD8, células NK y linfocito B están desmetilados.

25 La Figura 10 muestra los diversos amplicones analizados que se muestran en las figuras 1 y 2, cuando se representan sobre el cromosoma 6 en el genoma humano. Se muestran los amplicones y el número de CpG por amplicón se indica en los círculos.

30 La Figura 11 muestra la reproducibilidad del patrón de metilación de ADN (amplicon 888) para CCR6 que se analizó a partir de dos donantes y se clasificó en CD4⁺CD45RA⁺ y CD4⁺ CD45RA⁻. Cada columna representa un subconjunto de glóbulos sanguíneos con cada fila representando un único sitio de CpG (posición en el amplicon indicado en la izquierda). Se midió la metilación de ADN por medio de secuenciación de bisulfitos. Los niveles de metilación de CpG (barra izquierda) están codificados en color según la escala de la gama de colores de gris claro (0 % de metilación) a gris oscuro (100 % de metilación).

35 Las Seq IDs No 1 a 12, y 14 a 28 muestran los cebadores y sondas tal como se usan en los ejemplos.

La Seq ID No 13 muestra la región que solapa la región del promotor del gen *ccr6* de acuerdo con la invención.

La Seq ID No 29 muestra la secuencia del amplicon 1037.

Ejemplos

40 Aunque los siguientes ejemplos se realizaron principalmente en el contexto de un análisis de una región desmetilada preferente del gen *CCR6*, el experto en la técnica se dará cuenta que estos experimentos pueden ajustarse fácilmente para un análisis de metilación de otras regiones relevantes del gen tal como se describe en el presente documento para *CCR6*.

Material y procedimientos

Células, anticuerpos y citometría de flujo

45 Se obtuvieron capas leucocitarias (DRK Blutspendedienst, Berlín, Alemania) y las muestras de sangre periférica a partir de donantes sanos después de un consentimiento informado de acuerdo con la aprobación del comité ético local. Las CMSP se separaron con gradiente Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich). Los antígenos de superficie celular se analizaron mediante análisis clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de parámetro único o multiparámetro usando los siguientes anticuerpos monoclonales: PE-anti-CCR6 (11A9) y Alexa700-anti-CD4 (RPA-T4) (ambos de BD Biosciences). APC-anti-CD25 (BC96) se compró de ebioscience. PE-Cy5-anti-CD8 (B9.11), PE-Cy5-anti-CD56 (N901) y FITC-anti-CD25 (B1.49.9) de Beckman Coulter. Anticuerpos generados en casa (DRFZ, Berlin): FITC-anti-CD45RA (4G11), Alexa405-anti-CD4 (TT1) y Alexa405-anti-CD3 (OKT3). En algunos experimentos, se detectó la expresión CCR6 mediante inmunofluorescencia indirecta usando CCR6 biotinilado (11A9, BD Biosciences) seguido de tinción con estreptavidina conjugada con CPA (SouthernBiotech). Las tinciones se realizaron en solución salina tamponada con fosfato que contenía un 0,5 % albúmina de suero bovino para

bloquear la unión no específica. Se usó un FACSCanto II (BD Biosciences) para la adquisición de datos y el análisis se llevó a cabo usando un software FlowJo (Treestar).

Aislamientos de linfocitos T y clasificación FACS®

5 Se enriquecieron linfocitos T CD4⁺ y CD8 totales a partir de CMSP usando perlas magnéticas anti-CD4 o anti-CD8, respectivamente, y el sistema de separación autoMACS de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Después de una posterior tinción con anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD45RA y anti-CCR6 las siguientes poblaciones celulares se clasificaron en un clasificador celular FACS Aria® o FACSDiva® (BD Biosciences): linfocitos T CD4⁺ intactos (CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺), Tregs CD4⁺ (CD4⁺CD25^{alto}), linfocitos T CD4⁺ intactos CCR6⁻, linfocitos T CD4⁺ de memoria CCR6⁻ (CD4⁺CD25⁻CD45RA⁻), linfocitos T CD4⁺ de memoria CCR6⁺, linfocitos T CD8⁺ de memoria CCR6⁻ (CD8⁺CD25⁻CD45RA⁺), linfocitos T CD8⁺ de memoria CCR6⁻ (CD8⁺CD25⁻CD45RA⁻) y linfocitos T CD8⁺ de memoria CCR8⁺. Después de un re-análisis, las células clasificaron mostraron de forma rutinaria un >98 % de pureza. Las células aisladas *ex vivo* se usaron para o bien análisis de metilación o bien para cultivos celulares *in vivo* (véase a continuación).

Cultivos de linfocitos T de linfocitos T CD4⁺ intactos y de memoria

15 Para los ensayos de cultivo *in vitro*, se cultivaron células en medio RPMI 1640 Glutamax (Invitrogen) que contenía 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 1 mM de piruvato de sodio, estimulación no esencial, β-mercaptoetanol y 5 % de suero humano (medio completo [MC]). Para la estimulación de linfocitos T CD4⁺ intactos, se cultivaron células de 1x10⁵ en MC suplementado con 20 ng/ml IL-2 (R&D Systems) y 2 µg/ml de anticuerpos neutralizadores frente a IL-4, IL-12 y IFN-γ (condiciones neutras, anticuerpos de BD Biosciences) en placas de microtítulo de fondo plano en perlas magnéticas de 1x10⁵ con anti-CD3 y anti-CD28 (Dynabeads, Invitrogen) durante 20 cuatro días seguido por una transferencia en el MC que contenía 1000U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron). Para la inducción de CCR6 sobre células CD4⁺, se añadieron las siguientes citoquinas al inicio del cultivo: 10 ng/ml de TGF-β, 10 ng/ml de IL-6, 10 ng/ml de IL-1, 10 ng/ml de TNF-α (R&D). En algunos experimentos, la estimulación de células se repitió hasta tres veces en las mismas condiciones. Para la inducción de CCR6 sobre células CD4⁺ intactas con el fármaco inhibidor de metilación 5'-azacitidina (Aza, Sigma-Aldrich) se añadieron 5 µM de Aza después de 25 de cultivo.

Se tiñieron linfocitos de memoria CD4⁺CCR6⁺ y CD4⁺CCR6⁻ con éster de carboxifluoresceína succinimidil diacetato (CFSE) y se cultivaron o bien en MC que contenía perlas magnéticas tal como se ha descrito anteriormente o bien en 10 ng/ml de IL-7 y 10 ng/ml de IL-15 (R&D Systems). Después de cuatro días solo los cultivos que contenía 30 Dynabeads se transfirieron en MC que contenía 1000 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron). Al final de los cultivos, se analizaron las células mediante citometría de flujo y se usaron para análisis de metilación (véase a continuación).

Ensayo de indicador de luciferasa

La región diferencialmente metilada del locus CCR6 humano se amplificó mediante RCP usando ADNc humano como un molde y los siguientes cebadores: (A) 5'-GACTACGCGTCAGTAAGGGGAGCCACTG-3' (SEQ ID NO 11), 35 (B) 5'-GACTAGATCT CAAGGAAAGCAGCTGACGA-3' (SEQ ID NO 12). El elemento bp amplificado 501 se clono mediante *MluI* y *BglII* en el vector de promotor pGL3 (Promega) en frente de un promotor SV40 mínimo para generar pGL3-CCR6. La secuenciación de la región clonada reveló un 100 % de identidad con la secuencia de la región de CCR6 del genoma de homo sapiens almacenado en Ensembl.

Se realizó la transfección de linfocitos T CD4⁺ total clasificados con MACS usando 2,5 µg de vector de promotor pGL3 o vector pGL3-CCR6. Se usó vector de indicador de luciferasa renilla sintético (pRL-TK; Promega) (1,5 µg) como control interno para la eficacia de transfección. 4 h después de la transfección mediante nucleofección (lonza), se cultivaron células en medio RPMI 1640 que contenía IL-2 o antes de estimularse durante 4 h con PMA (10 ng/ml; Sigma) e Ionomycin (500 ng/ml; Sigma). Después de 48 h de cultivo, las células se recogieron y se midió la actividad de la luciferasa usando el sistema de ensayo de luciferasa dual (Promega). Los datos se normalizaron con respecto 45 a la actividad luciferasa renilla.

Cebadores, preparación de ADN, conversión de bisulfitos, RCP y secuenciación

Se usaron cebadores para el RCP bisulfito-específico y reacciones de secuenciación. Se aisló ADN genómico a partir de subconjuntos de linfocitos T clasificados usando el kit de tejidos DNeasy (Qiagen) siguiendo el protocolo para células animales cultivadas. El tratamiento de bisulfitos de ADN genómico se realizó tal como se ha descrito 50 anteriormente (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996;24:5064-5066.). Se realizó RCP en un volumen final de 25 µl que contenía 1× tampón de RCP, 1 U de Taq ADN polimerasa (Qiagen), 200 µM de dNTP, 12,5 pmol cada uno de los cebadores directo e inverso, y 7 ng de ADN genómico tratado con bisulfitos a 95 °C durante 15 min y 40 ciclos de 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 45 seg y 72 °C durante 1 min, y una etapa final de extensión de 10 min a 72 °C. Los productos del RCP se purificaron usando ExoSAP-IT (USB Corp.) y secuenciaron aplicando los cebadores de RCP y el ABI Big Dye Terminator v1.1-chemistry (Applied Biosystems) seguido por electroforesis capilar sobre un analizador genético ABI 3100. Los archivos 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.).

Ejemplos de cebadores y sondas preferentes son:

Cebador de amplificación de amplicon 888 (para secuenciación de bisulfitos):

5 Fw: (888p) GTTAGTGGGGTTGAGTAGGATA (SEQ ID No. 1)
Rev: (888o) AAAACCCTAAAATCACAAAATA (SEQ ID No. 2)

Cebador de amplificación de amplicon 1201 (para secuenciación de bisulfitos):

1201q TTGGTAATGTTTGTGGAAAG (SEQ ID No. 3)
1201r CTCCTAAATCCCTCAACATCTA (SEQ ID No. 4)

Cebador de amplificación de amplicon 1202 (para secuenciación de bisulfitos):

10 1202o AAACCTCACAACTTCCTTCACTC (SEQ ID No. 5)
1202p AAGGGTAGTGTTAGAGGGTATTT (SEQ ID No. 6)

Cebador de amplificación de amplicon 1203 (para secuenciación de bisulfitos):

1203o CACCTAATCTTCATATAACACAAAA (SEQ ID No. 7)
1203p GGTATAGTGTATTGGGAAGTGG (SEQ ID No. 8)

15 Cebador de amplificación de amplicon 1204 (para secuenciación de bisulfitos):

1204r TCTCTTTTTCTTATCACTTTACCA (SEQ ID No. 27)
1204q TGTTTTTAGGAAAGGAAGTTTG (SEQ ID No. 28)

Cebador de amplificación de RDM (para secuenciación de bisulfitos):

20 Sistema-RCP de CpG (Metil) - específico
Fw-Cebador GAGATGATAAGGGGTGC (SEQ ID No. 14)
Rev-Cebador ACACCTCACCTAAATCG (SEQ ID No. 15)
Sonda HEX-TTAGGCGTGAGGACGTGGAGTT-BHQ1 (SEQ ID No. 16)

25 Sistema-RCP de TpG (De-Metil) - específico
Fw-Cebador GAGATGATAAGGGGTGT (SEQ ID No. 17)
Rev-Cebador ACCACACCTCACCTAAATCA (SEQ ID No. 18)
Sonda FAM-ATTTAGGTGTGAGGATGTGGAGTTTAGGG-BHQ1 (SEQ ID No. 19)

La región diana genómica del ensayo RDM de CCR6 se indica en negrita, y los CpG se subrayan

**GCCAGTGGGGTTGAGCAGGACACAGGTCCTGCTGTGTCTAGCTGGTTC^{CG}CCAGAG
AGATGATAAGGGGTG^{CG}CTCCAGCTTCTCAGGCTCACTCAGG^{CG}CTGAGGAC
GTGGAGCTCAGGGCTCTGCAGGAAGGAG^{CG}ACCCAGGTGAGGTGTGGTCAA
GATAGAGCAGAGCTGGGCAG^{CG}GGCAGTGGAGCCT^{CG}TGGGCAGCCTGGGGGTG
GGGAGGCACAGTGC^{CG}ACTGGGAAGTGGAGAAAGTGTGAGTCCATCAGGCTGGCTG
AGAATTGATCAC^{CG}AACCTATTGTCTGTAAACTTTTGTATTTCCTGAGAC^{CG}TGGT
TCACAGCAACCCAGGTG^{CG}AACAGCCTTGTGATTCTAGGGTTCT (SEQ ID No. 13)**

Análisis mediante simulación por ordenador

30 Para la predicción de los sitios de unión del factor de transcripción putativo se uso la herramienta MatInspector (Genomatix).

Estadística

Los datos se expresan como la media ± SD. Las diferencias entre los grupos se evaluaron usando la prueba Mann-Whitney o el ensayo de rangos Wilcoxon tal como se indica. Los valores P < 0,05 se consideraron importantes.

35

Ejemplo 1**Una región no codificante del locus *CCR6* muestra una metilación diferencial que se correlaciona con la expresión de *CCR6*.**

Los inventores ha llevado a cabo previamente un reconocimiento de genes regulados epigenéticamente en Treg humanos mediante la comparación de linfocitos T CD4⁺ intactos convencionales y Treg CD25^{alto}CD4⁺ usando la técnica de hibridación de metilación diferencial (HMD) (Baron U, Floess S, Wieczorek G, y col. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. Eur J Immunol. 2007;37:2378-2389). En este reconocimiento HMD, el *CCR6* apareció entre los genes metilados diferencialmente. La región diferencialmente metilada preferente se encuentra aguas arriba de los dos transcritos *CCR6* informados y se solapa con un promotor de *CCR6* putativo (Fig. 1A). Para confirmar los datos DMH, los inventores realizaron secuenciación de bisulfitos usando ADN genómico a partir de linfocitos T CD45RA⁺CD4⁺ intactos convencionales y Treg CD25^{alto}CD4⁺ aislados a partir de sangre humana periférica. Los Treg CD25^{alto}CD4⁺ mostraron una región *CCR6* ampliamente desmetilada (metilación promedia del 23,8 %), mientras que los linfocitos T intactos convencionales fueron casi completamente metilados (metilación promedia del 81 %) (Fig. 1B).

Además de los Tregs (Kleinewietfeld M, Puentes F, Borsellino G, Battistini L, Rotzschke O, Falk K. LCCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25+CD4+ T-cell subset. Blood. 2005;105:2877-2886.) se ha informado de la expresión de *CCR6* para ambos linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Para comprender si la desmetilación observada del locus *CCR6* está reducido a la fracción de células que expresan el *CCR6 ex vivo*, se clasificaron subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ T de acuerdo con la expresión de *CCR6* y CD45RA (Fig. 2A) y se analizaron mediante secuenciación de bisulfitos del locus *CCR6*. Ambos linfocitos T CD45RA⁺CD4⁺ intactos que carecen de la expresión de *CCR6* así como linfocitos T CCR6⁻CD45RA⁻CD4⁺ se metilaron en gran medida, mientras que linfocitos T de memoria CD4⁺ que expresan *CCR6* mostraron una casi completa desmetilación de la región *CCR6* analizada (Fig. 2B). Aunque los linfocitos T CD8⁺ mostraron un nivel inferior completo de metilación de ADN, los linfocitos T de memoria CCR6⁺CD8⁺ mostraron claramente una región de *CCR6* menos metilada cuando se comparó con linfocitos T de memoria CCR6⁻CD8⁺ (Fig. 2B). De acuerdo con estos datos, los subconjuntos de leucocitos de sangre periférica que carecía de expresión de *CCR6*, tales monocitos CD14⁺ en reposo y granulocitos CD15⁺, mostraron una región de *CCR6* casi completamente metilada (metilación promedia >84 %), mientras que las células NKT y CD56⁺ que expresan *CCR6* y linfocitos B maduros fueron desmetilados completamente en este sitio. Conjuntamente, los datos de los inventores muestran que la expresión de *CCR6* se correlaciona con la desmetilación de la región de *CCR6* en leucocitos humanos.

Los linfocitos T CCR6⁺ expresan de forma estable CCR6 en la expansión *in vitro* y mantienen una región de CCR6 desmetilada.

Para investigar si tanto la expresión de *CCR6* sobre linfocitos T de memoria CD4⁺ como el patrón de metilación correspondiente de la región de *CCR6* analizada fueron estables cuando se produjo la división celular, se marcaron linfocitos T CCR6⁺CD25⁻CD45RA⁻CD4⁺ con CFSE y o bien estimulados con citoquinas que median el volumen homeostático de linfocitos de memoria o bien mediante desencadenamiento a través del RLT. En consistencia con los anteriores informes (Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. J Exp Med. 2001;194:1711-1719), los linfocitos T de memoria proliferaron en presencia de citoquinas homeostáticas tales como IL-7 e IL-15 y todas las células proliferantes mantuvieron altos niveles de expresión de *CCR6* incluso después de múltiples divisiones celulares (Fig. 3A). La estimulación RLT dio como resultado una regulación de la expresión de *CCR6* (Sallusto F, Kremmer E, Palermo B, y col. Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. Eur J Immunol. 1999;29:2037-2045), la cual fue inhibida por TGF-β y promovida por IL-4 (Fig. 3A y B). Sin embargo, en todas las condiciones de estimulación evaluadas el estado de metilación de la región de *CCR6* permanecieron sin cambiar y mostraron un bajo nivel comparable de metilación (Fig. 3C). De manera importante, la expresión de *CCR6* de regulación inducida por RLT fue solo transitoria, puesto que las células *CCR6*^{bajo} que habían perdido la expresión de *CCR6* en la estimulación RLT re-expresaron rápidamente el *CCR6* después del cultivo en ausencia de la estimulación RLT (Fig. 3D). Por lo tanto, la desmetilación de la región de *CCR6* está unido a la estabilidad a largo plazo de la expresión de *CCR6*.

La inducción *in vitro* de la expresión de CCR6 no es estable y no conduce a la desmetilación de la región de CCR6.

La expresión de *CCR6* puede inducirse *in vitro* sobre una fracción de linfocitos T CD4⁺ intactos cuando se activan en presencia de un cóctel de citoquinas inflamatorias (TNF-α, IL-6, IL-1) más TGF-β. Los inventores analizaron si esta inducción *de novo* de la expresión de *CCR6* está asociada con una desmetilación de la región *CCR6*. Se estimularon linfocitos T CD4⁺ intactos con Dynabeads® anti-CD3/anti-CD28 en presencia de citoquinas inflamatorias y TGF-β. En el día 6 del cultivo *in vitro*, una fracción significativamente mayor de linfocitos T expresaron *CCR6* cuando se compararon con los linfocitos T estimulados en ausencia de citoquinas (Fig. 4A). Sin embargo, ambas poblaciones fueron casi completamente metiladas dentro de la región de *CCR6*, sin mostrar diferencias con los linfocitos T intactos (Fig. 1B y 2B). Incluso después de clasificarlos en linfocitos CCR6⁻ y CCR6⁺, no se pudo observar una desmetilación selectiva de la región de *CCR6* dentro de los linfocitos CCR6⁺ inducidos *de novo* (Fig. 4B). Aunque la

estimulación repetitiva en presencia del cóctel de citoquinas aumentó adicionalmente la frecuencia de los linfocitos CCR6⁺, la desmetilación de la región de CCR6 aún no era detectable (Fig. 4C y 4D), demostrando que el cóctel de citoquinas inflamatorias solo fue suficiente para inducir la expresión de CCR6, pero no la desmetilación en el locus CCR6. En contraste con linfocitos T de memoria CD4⁺ aislados *ex vivo*, la inducción *de novo* de CCR6 en linfocitos T intactos mediante estimulación RLT en presencia de citoquinas inflamatorias condujo solo a la expresión de CCR6 transitoria, y prácticamente todas las células perdieron la expresión de CCR6 cuando se sometieron a una cultivo *in vitro* prolongado en ausencia de las citoquinas inductoras (Fig. 4D).

La inhibición de la metilación de ADN lleva a una expresión de CCR6 parcialmente estable en linfocitos T intactos cultivados.

El estado de metilación de ADN puede manipularse farmacológicamente mediante inducción de réplica de ADN en presencia de inhibidores de ADN-metiltransferasa tales como 5'-azacitidina (Aza). Para investigar si la desmetilación de la región de CCR6 analizada está implicada en la estabilización de la expresión de CCR6, los inventores activaron linfocitos T CD4⁺ intactos con Dynabeads® anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de Aza. De forma sorprendente, el tratamiento con Aza indujo expresión de CCR6 en una fracción significativa de células incluso en ausencia de citoquinas exógenas y en estas células tratadas con Aza se pudo detectar una desmetilación clara de la región de CCR6 (Fig. 5A). De forma interesante, cuando los linfocitos CCR6⁺ inducidos con Aza se clasificaron y re-estimularon en condiciones neutras en ausencia de Aza, se observó una destacable estabilidad de la expresión de CCR6 en estas células, demostrando además que la desmetilación del locus CCR6 controla la expresión de los receptores de citoquinas en los linfocitos T.

El elemento diferencialmente metilado del locus CCR6 albergan actividad transcripcional.

La región diferencial metilada preferente del locus CCR6 se ubica en las bases 444/446 aguas arriba de dos transcritos de CCR6 previstos (Fig. 1A). La región de CCR6 se solapa parcialmente con una región del promotor prevista mediante simulación por ordenador. Los elementos típicos del promotor como un sitio de inicio transcripcional no se detectaron en la región de CCR6, sino sitios de unión putativa para los reguladores transcripcionales PPAR, GATA, AHR, ETS1 o RXR, algunos de ellos, por ejemplo, ETS1, uniéndose de un modo dependiente de la metilación a sus secuencias diana (Maier H, Colbert J, Fitzsimmons D, Clark DR, Hagman J. Activation of the early B-cell-specific mb-1 (Ig-alpha) gene by Pax-5 is dependent on an unmethylated Ets binding site. Mol Cell Biol. 2003;23:1946-1960, y observaciones propias no publicadas).

Para analizar el papel de la región de CCR6 para su regulación transcripcional de la expresión de CCR6, los inventores clonaron este elemento en un vector de indicador de luciferasa, que contiene un promotor mínimo SV40, permitiendo la detección de elementos potenciadores transcripcionalmente activos. En la transfección en linfocitos T CD4⁺ totales a partir de sangre periférica, la actividad transcripcional de la región de CCR6 que contenía la construcción de indicador de luciferasa se aumentó en aproximadamente 2,4 veces en comparación con el vector de control vacío (Fig. 6). De forma interesante, la actividad transcripcional de la región de CCR6 fue independiente del estado de activación de las células puesto que la estimulación de los linfocitos T CD4⁺ transfectados con PMA más ionomicina llevó a resultados comparables. Estos hallazgos demuestran que la región diferencialmente metilada del locus CCR6 muestra actividad potenciadora independientemente de las señales mediadas por RLT, sugiriendo que este elemento está funcionalmente implicado en el mantenimiento de la expresión de CCR6 estable en linfocitos T de memoria.

Ejemplo 2

Se purificaron distintas especies de linfocitos T y FACS clasificados a partir de dos donantes independientes. Se separaron las células usando CD4 y CD8 como marcadores para la segregación de linfocitos T citotóxicos y colaboradores. A continuación, estas poblaciones se separaron adicionalmente en poblaciones de linfocitos intactos y de memoria empleando CD45RA. Las poblaciones de memoria se separaron adicionalmente en poblaciones CCR6 positivo y CCR6 negativo. Los resultados se resumen en la siguiente tabla 1.

Tabla 1: Patrón de metilación del gen según la invención (véase figura 8)

Tipo celular	Metilación CCR-6 (Amplicon 888), Figura 8
Granulocitos	+
Monocitos	+
Células NK	-
Linfocitos T intactos	+
Linfocitos T de memoria	-
Linfocitos T citotóxicos intactos	+
Linfocitos T citotóxicos de memoria	-

(continuación)

Tipo celular	Metilación CCR-6 (Amplicon 888), Figura 8
Linfocitos B intactos	-
Linfocitos B de memoria	-

Las muestras se sometieron adicionalmente a análisis RCPc dirigido a las posiciones CpG de CCR6 71,98, 106 y 135 en el amplicon 888 para confirmar los datos de secuenciación de bisulfitos que se muestran en la figura 11. El par de cebadores específico (específico a "CpG") de metilación usado se muestra en la SEQ ID No. 14/15, la sonda correspondiente se muestra en la SEQ ID No. 16; para la detección de secuencias desmetiladas (específicas a "TpG") el par de cebadores que se muestra en la SEQ ID No. 17/18 se usó en conexión con la sonda de la SEQ ID No. 19. Los resultados se resumen en la Tabla 2. Los resultados de secuenciación de bisulfitos que se muestra en la figura 11 podría confirmarse en la prueba de RCPc.

Tabla 2: muestra el patrón de metilación de ADN (amplicon 888) para CCR6 que se analizó a partir de dos donantes y se clasificó en CD4⁺CD45RA⁺ y CD4⁺ CD45RA⁻

Muestras							Análisis de datos	
	específico a "TpG"			específico a "CpG"			Modo: 2º derivado	
Descripción	CP	S.D.	Número de copias	CP	S.D.	Número de copias	"TpG". [%]	"CpG". [%]
12,500 Copias	25,29	0,02	13968,04	25,65	0,03	12676,28	De-Metilo.	Metilo.
2,500 Copias	27,92	0,01	2265,25	28,00	0,01	2583,61		
500 Copias	30,27	0,15	449,02	30,33	0,09	532,49		
100 Copias	32,55	0,09	92,37	33,15	0,01	78,44		
20 Copias	34,61	0,03	22,26	34,89	0,23	24,33		
CD4+CD45RA+CCR6-Donante #1	33,95	0,50	36,44	27,15	0,18	4615,12	0,8	99,2
CD4+CD45RA-CCR6+Donante #1	27,24	0,38	3697,32	27,92	0,16	2721,32	57,6	42,4
CD4+CD45RA-CCR6-Donante #1	31,21	0,45	242,03	26,73	0,12	6126,05	3,8	96,2
CD4+CD45RA+CCR6-Donante #2	33,84	0,32	38,41	26,47	0,24	7338,90	0,5	99,5
CD4+CD45RA-CCR6+Donante #2	29,07	0,24	1039,11	29,59	0,06	873,96	54,3	45,7
CD4+CD45RA-CCR6-Donante #2	34,50	0,23	24,11	27,67	0,10	3228,76	0,7	99,3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Epiontis GmbH

<120> Detección de células inmunes, en particular linfocitos T mediante análisis de metilación de ADN de los genes CCR6 y BLR1

<130> E31443PCT

<150> US 61/329.229

<151> 2010-04-29

<160> 29

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 22

	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 1	
	gttagtgggg ttgagtagga ta	22
5	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 2	
10	aaaaccctaa aatcacaaaa cta	23
	<210> 3	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 3	
15	ttgtaatgt ttgttgga ag	22
	<210> 4	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 4	
	ctcctaaatc cctcaacatc ta	22
	<210> 5	
	<211> 22	
25	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 5	
	aaactcacia ctccttcac tc	22
	<210> 6	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 6	
	aaggtagtg ttagaggta ttt	23
35	<210> 7	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 7	
40	cacctaact tcatataaca caaaa	25
	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 8	
45	ggtatagtgt attgggaagt gg	22
	<210> 9	
	<211> 24	
	<212> ADN	
50	<213> Homo sapiens	
	<400> 9	
	ccttatctac ttctccaca aaat	24

ES 2 657 846 T3

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

5 <400> 10
 agtgatgagt tgtgaggtag gt 22

<210> 11
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 11
 gactacgct cagtaagggg gagccactg 29

<210> 12
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 12
 gactagatct caaggaaagc agctgacga 29

<210> 13
 <211> 365
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 13

gccagtgggg ttgagcagga cacaggctct gctgtgtcta gctggttccc cagagagatg 60
ataaggggtg cgctccagct tctcaggctc actcaggcgt gaggacgtgg agctcagggc 120
tctgcaggaa ggagcagccc aggtgaggtg tgggtcaagat agagcagagc tgggcagcgg 180
gcagtgagagc ctcgtagggca gcctgggggt ggggagggcac agtgcactgg gaagtggaga 240
aagtgtgagt ccatcaggct ggctgagaat tgatcacgaa cctattgtct gtaaaacttt 300
tgttatttcc tgagacgtgg ttcacagcaa cccagggtgcg aacagccttg tgattctagg 360
gttct 365

25 <210> 14
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 14
 gagatgataa ggggtgc 17

<210> 15
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

35 <400> 15
 acacctacc taaatcg 17

<210> 16
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 16
 ttaggcgtg aggacgtgga gtt 23

<210> 17
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 17
 gagatgataa ggggtgt 17
 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 accacacctc acctaaatca 20
 <210> 19
 <211> 29
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 atttaggtgt gaggatgtgg agtttaggg 29
 <210> 20
 <211> 17
 <212> ADN
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 gagatgataa ggggtgc 17
 25 <210> 21
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 30 acacctcacc taaatcg 17
 <210> 22
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 22
 ttaggcgtg aggacgtgga gtt 23
 <210> 23
 <211> 17
 <212> ADN
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 gagatgataa ggggtgt 17
 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 accacacctc acctaaatca 20
 <210> 25
 <211> 29
 <212> ADN
 50 <213> Homo sapiens

ES 2 657 846 T3

<400> 25
 atttagtgt gaggatgtgg agtttaggg 29

<210> 26
 <211> 463
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 26

tctctttttc ttatcacttt accattgggtt ggactttgat tccagggatc ctacgattac 60
 tcaataccct acaggatata catggttaac catttgcatt tgggcaaata ggcgttactt 120
 ttcaatagga agtggcaatc cagaacttgc ttttgggcaa ttctagtagc tcaccgcttt 180
 tttcttaatg actgctagaa gctgcatcctt attgacagat ggtcatcaca ttggtgagct 240
 ggagtcatca gattgtgggg cccggagtga ggctgaaggg agtggatcag agcactgcct 300
 gaggtgagca tgccaaggcc cctgagactt ttctttcaaa aatgtaactt ctttgatccc 360
 ctagtctgac aggaatggga ctgttttact cattaatcctt ccagaatgct ggcatattga 420
 ccatgtttat gcttaacgac acagacttcc tttcctgaaa gca 463

<210> 27
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 27

tctcttttc ttatcacttt acca 24

<210> 28
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 28

tgtttttagg aaaggaagtt tg 22

<210> 29
 <211> 406
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 29

agtgatgagt tgtgagggcag gtcgcggccc tactgcctca ggagacgatg cgcagctcat 60
 ttgcttaaat ttgcagctga cggctgccac ctctctagag gcacctggcg gggagcctct 120
 caacataaga cagtgaccag tctgggtgact cacagccggc acagccatga actaccgct 180
 aacgctggaa atggacctcg agaacctgga ggacctggtg agtagacacg ggtagcttcc 240
 tgtcgccgag gccctgtctg gaattctaac atcctttgcc agagtccgag ggagagggga 300
 cagtgtggga atcctctccc actgtggatc tgtaaaatct agacaggtca gtcagctccc 360
 gccctttaag agtttatctt ccattctgtg gaagaagcag ataagg 406

25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación de células inmunes de un mamífero, que comprende el análisis del estado de metilación de al menos una posición CpG en el gen *ccr6*, en el que una desmetilación, cuando se compara con un linfocito T no activado, es indicativa de una célula seleccionada a partir de linfocitos T activados estables, células NK, linfocitos T de memoria, en particular linfocitos T de memoria CD4⁺ o CD8⁺ y linfocitos T citotóxicos de memoria.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho estado de metilación de al menos una posición CpG en el gen *CCR6* se selecciona a partir de una metilación aumentada para el gen *CCR6* en granulocitos, monocitos, linfocitos T intactos y linfocitos T citotóxicos intactos cuando se comparan con una posición CpG respectiva en células NK, linfocitos T de memoria y/o linfocitos T citotóxicos de memoria.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho análisis del estado de metilación del gen *CCR6* comprende la amplificación con al menos uno de los pares de cebadores seleccionados a partir de la SEQ ID No. 1 y 2; SEQ ID No. 3 y 4; SEQ ID No. 5 y 6; SEQ ID No. 7 y 8, y SEQ ID No. 11 y 12, y pares de cebadores ortólogos o parálogos de los mismos, preferentemente en el que dicho análisis del estado de metilación comprende la amplificación con al menos uno de los pares de cebadores seleccionados a partir de la SEQ ID No. 5 y 6; SEQ ID No. 7 y 8; SEQ ID No. 11 y 12; y en el que dicho análisis del estado de metilación comprende preferentemente el análisis del estado de metilación de al menos una posición CpG seleccionada a partir del grupo que consiste en las posiciones 71, 98, 106, 135 178, 193, 277, 316, y 339 del amplicón según amplificado por el par de cebadores SEQ ID No. 1 y 2, posiciones 23, 36, 38, 53 y 114 del amplicón según amplificado por el par de cebadores de SEQ ID No. 3 y 4, posiciones 23, 109, 161, 193, 217 y 245 del amplicón según amplificado por el par de cebadores de SEQ ID No. 5 y 6, posiciones 62, 101, 124, 202, 246 y 251 del amplicón según amplificado por el par de cebadores de SEQ ID No. 7 y 8, posiciones 71, 98, 106, 135, 178, 193, 277 y 316 del amplicón según amplificado por el par de cebadores de SEQ ID No. 11 y 12.
4. Un procedimiento para el diagnóstico del estado inmune de un mamífero, que comprende las etapas de
- proporcionar una muestra que contiene células inmunes de dicho mamífero a diagnosticar,
 - analizar el estado de metilación de al menos una posición CpG en el gen *CCR6* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en dichas células inmunes,
 - identificar la cantidad de inmunes presentes en dicha muestra en base a dicho estado de metilación y
 - pronunciarse sobre el estado inmune de dicho mamífero en base a dicha cantidad como se ha identificado.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha muestra se selecciona a partir de una muestra sanguínea, una muestra de linfocitos sanguíneos o una fracción de los mismos, en particular una fracción de células CD3⁺.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que dicho mamífero es un paciente que padece una enfermedad seleccionada de enfermedades autoinmunitarias, efectos adversos en receptores de alotransplantes, enfermedades tumorales, cáncer de ovario, enfermedad de injerto contra hospedador, asma alérgica, esclerosis múltiple, inflamaciones, articulaciones inflamadas, artritis reumatoide, enfermedad psoriásica, enfermedad inflamatoria intestinal, encefalopatía y síndrome de inmunodesregulación - poliendocrinopatía - enteropatía ligada a X (IPEX).
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que dichas células inmunes son linfocitos T activados que se seleccionan a partir de linfocitos T intactos, linfocitos T de memoria y linfocitos T CCR6⁺ CD4⁺ o CCR6⁺ CD8⁺, en particular de linfocitos T CCR6⁺ CD4⁺ o CCR6⁺ CD8⁺ activados de forma estable.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que comprende adicionalmente la medición y/o control de la cantidad de dichos linfocitos T en respuesta a sustancias químicas y/o biológicas que modulan la expresión del gen *CCR6* en dicho linfocito T.
9. Un procedimiento *in vitro* de determinación de la idoneidad de células inmunes generadas *in vitro* o expandidas para una transferencia en un paciente, que comprende el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y detectar, si las posiciones CpG tal como se han analizado se han metilado hasta al menos el 80 %, preferentemente el 90 % y más preferentemente el 95 %.
10. Un procedimiento *in vitro* de identificación de sustancias químicas y/o biológicas que modulan la expresión de *CCR6* en una célula inmune, que comprende poner en contacto una o más de dichas sustancias químicas y/o biológicas con una célula inmune, realizar el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y detectar, si dicha sustancia química y/o biológica modula la metilación de las posiciones CpG tal como se ha analizado, en el que preferentemente dicha sustancia proporciona una desmetilación de las posiciones CpG tal como se ha analizado hasta al menos el 80 %, preferentemente el 90 % y más preferentemente el 95 %.
11. Un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID No. 1 a 12 o un amplicón, preferentemente de acuerdo con la SEQ ID No. 13, como se ha amplificado por un par de cebadores seleccionados a partir de las SEQ ID No. 1 y 2, SEQ ID No. 3 y 4, SEQ ID No. 5 y 6, y SEQ ID No. 7 y 8, y SEQ ID No. 9 y 10, y SEQ ID No. 11 y 12.

- 5
12. Un kit para identificar linfocitos T activados, preferentemente linfocitos T intactos o linfocitos T de memoria, en base al análisis del estado de metilación de las posiciones CpG en el gen *CCR6*, que comprende a) un reactivo de bisulfitos y b) al menos uno de los pares de cebadores seleccionados a partir de las SEQ ID No. 1 y 2; SEQ ID No. 3 y 4; SEQ ID No. 5 y 6; SEQ ID No. 7 y 8, y SEQ ID No. 11 y 12, y pares de cebadores ortólogos o parálogos de los mismos.
13. Uso de un oligómero o amplicón de acuerdo con la reivindicación 11 o un kit de acuerdo con la reivindicación 12 para detectar y/o identificar linfocitos T, preferentemente linfocitos T activados estables.

Figura 1

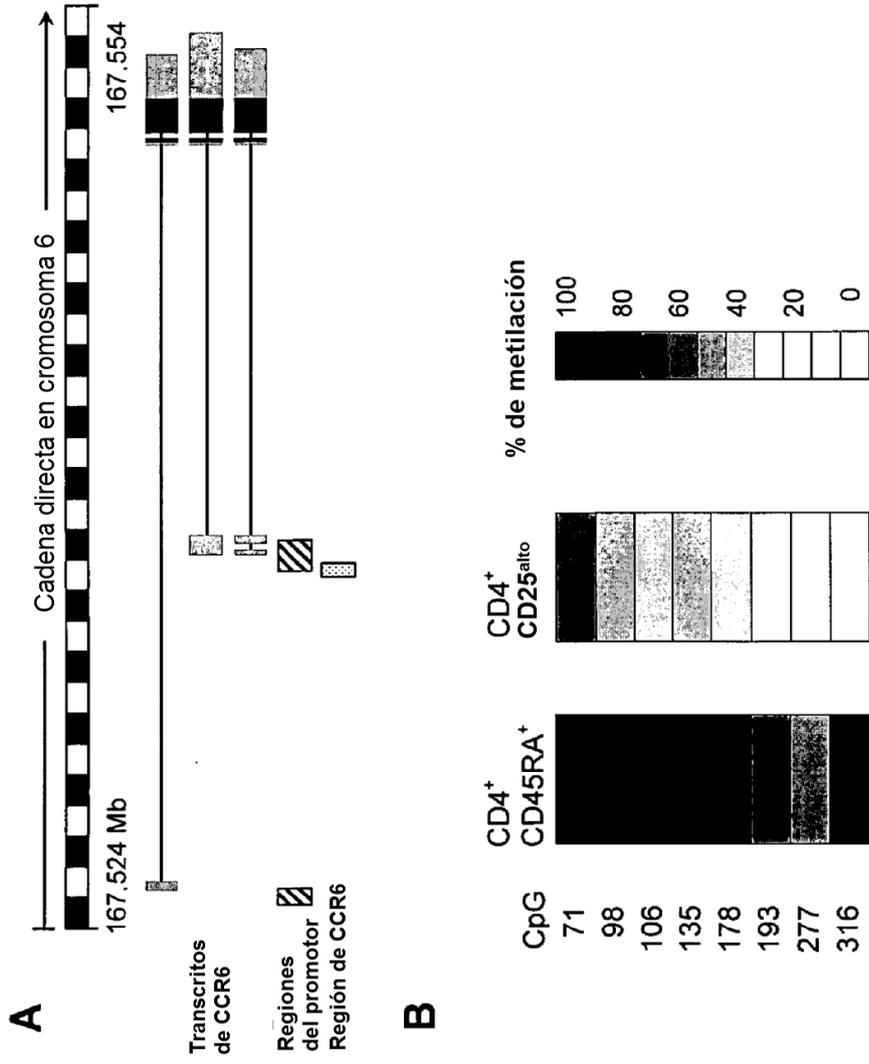


Figura 2

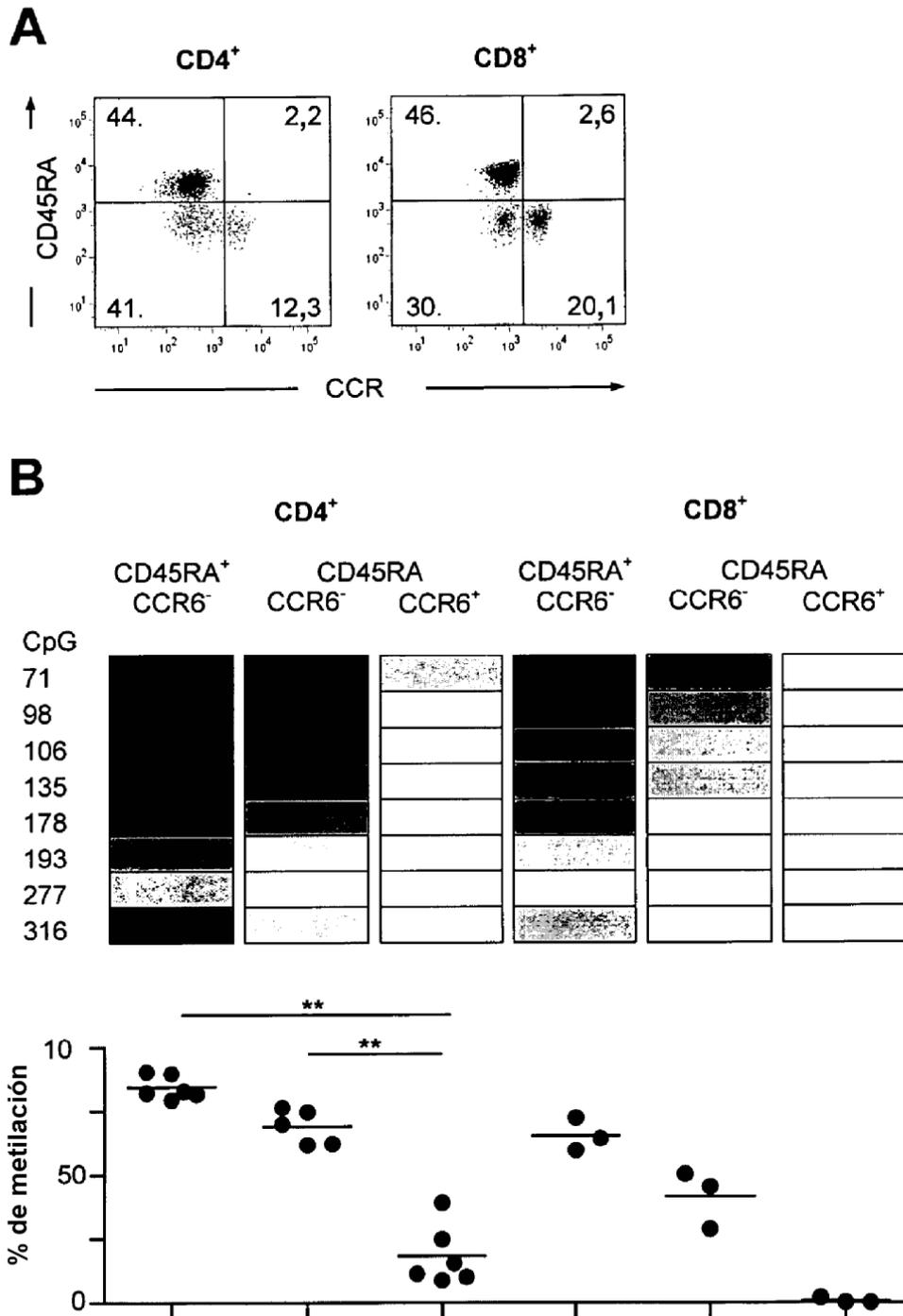


Figura 3

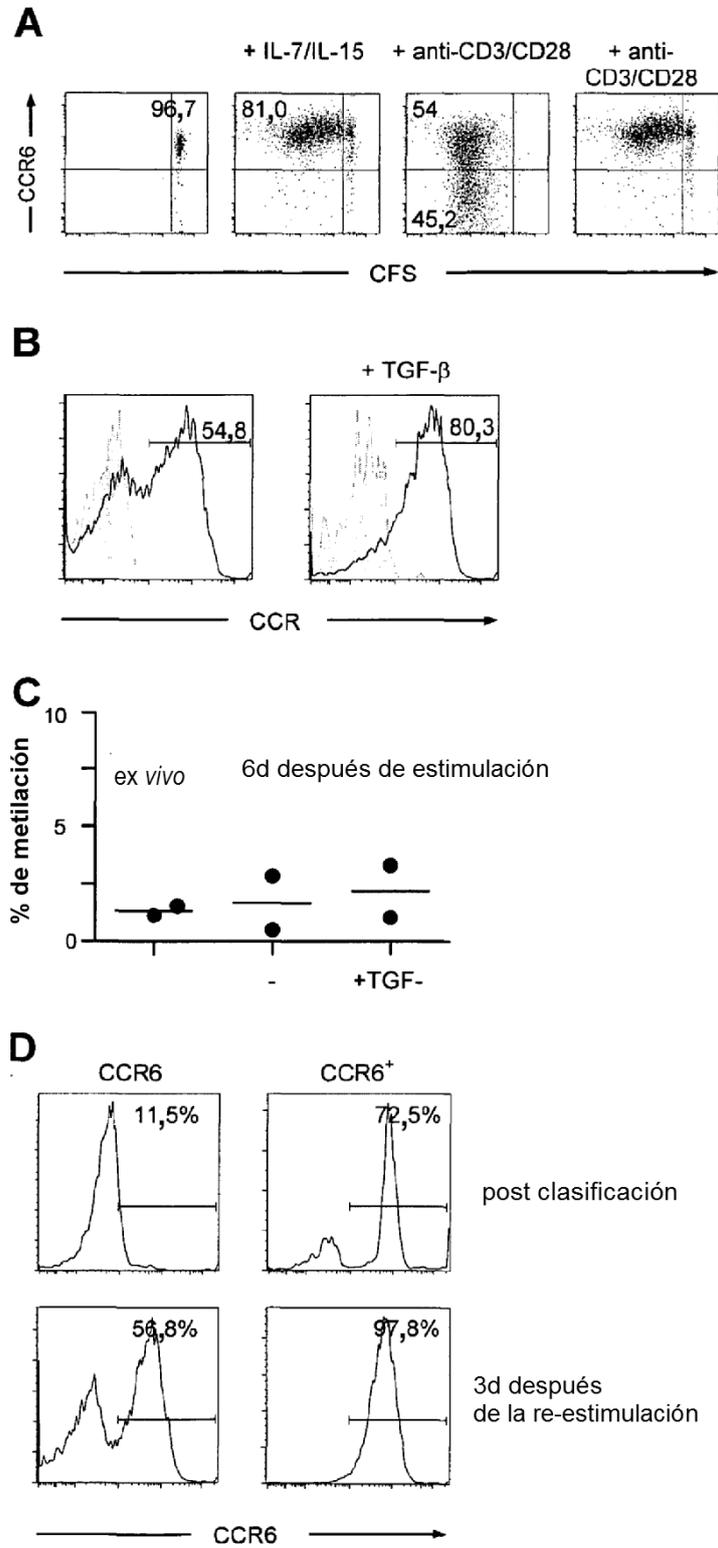


Figura 4

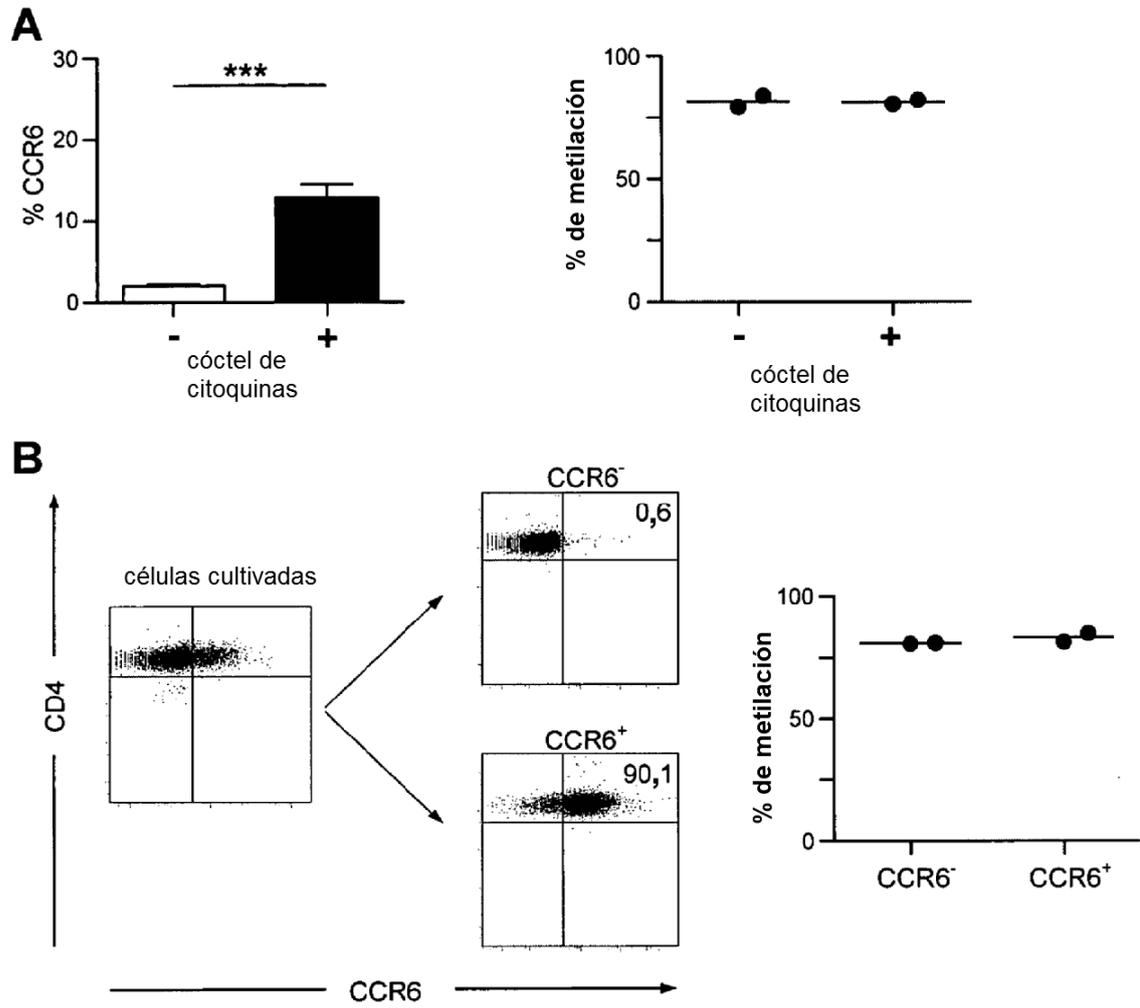


Figura 4 (cont.)

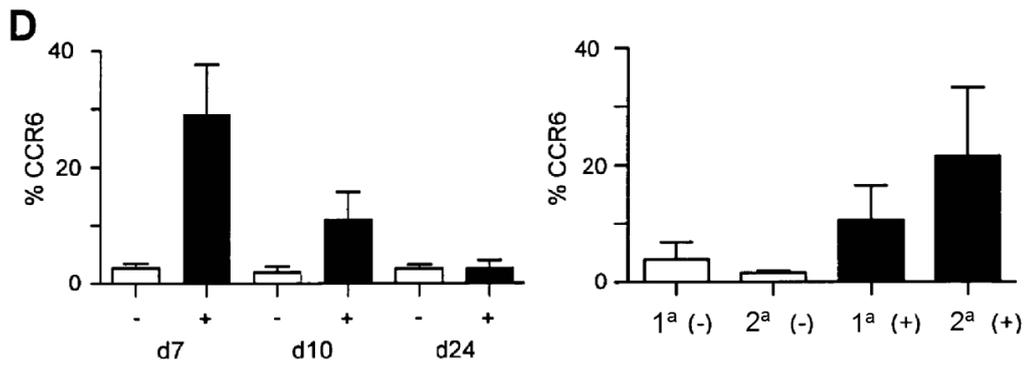
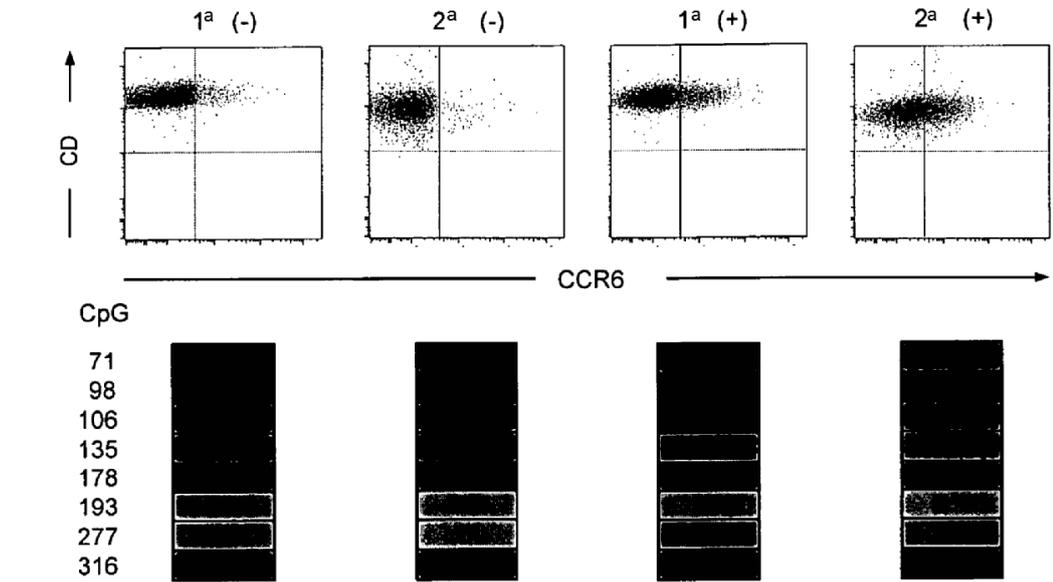


Figura 5

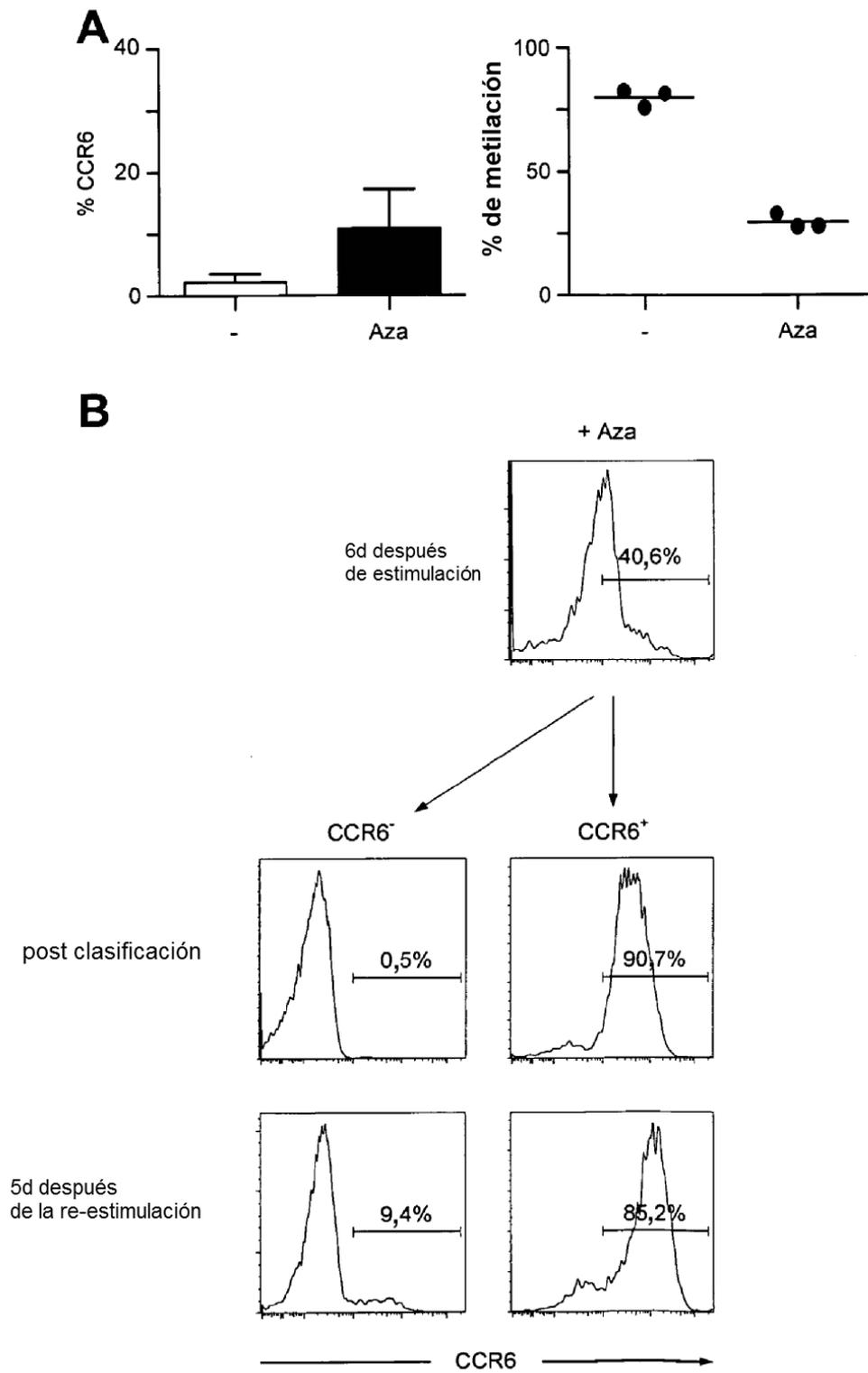


Figura 6

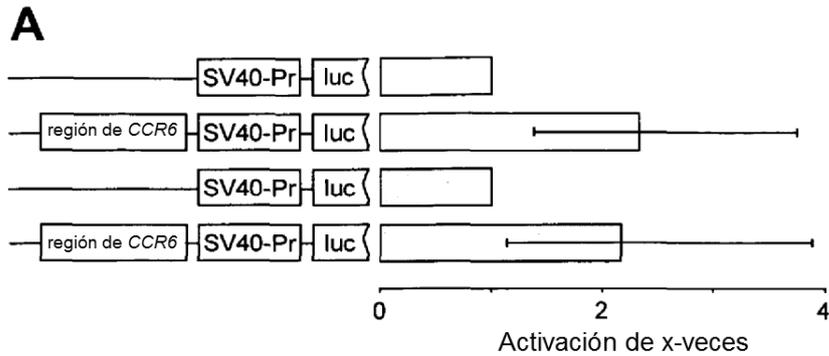


Figura 7

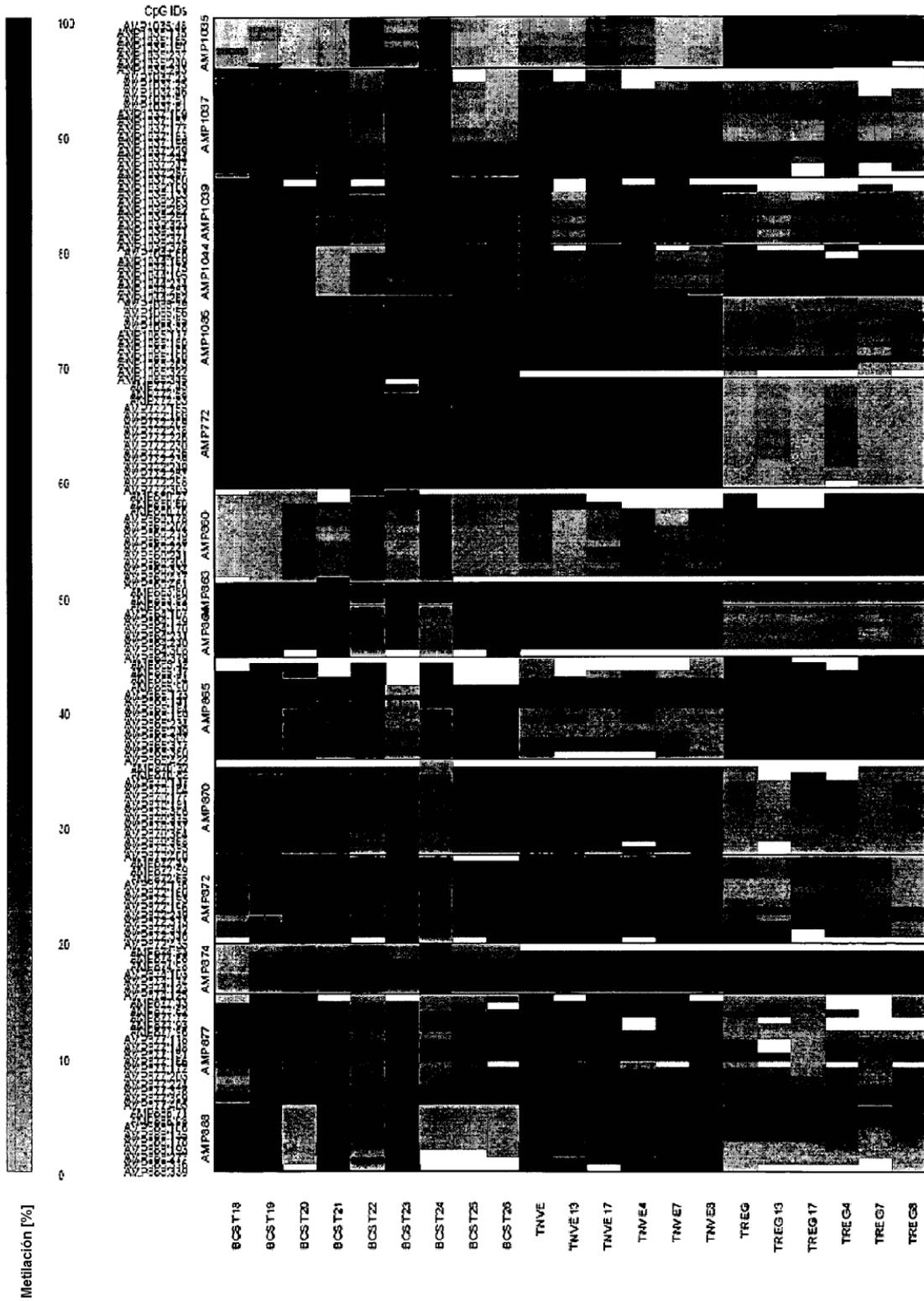
amplicón humano CCR6

Cromosoma 6: 167,535,449 – 167,535,813

```

GCCAGTGGGGTTGAGCAGGACACAGGTCTCTGCTGTGTCTAGCTGGTCCCCAGAGAGATGATAAGG
      71      RXR      98      106      GATA
GGTGCGCTCCAGCTTCTCAGGCTCACTCAGGCGTGAGGACGTGGAGCTCAGGGCTCTGCAGGAAGG
      135      AP1*      AHRR      178      193 ETS1
AGCGACCCAGGTGAGGTGTGGTCAAGATAGAGCAGAGCTGGGCAGCGGGCAGTGGAGCCTCGTGGG
      RXR      GATA
CAGCCTGGGGTGGGGAGGCACAGTGCCTGGAAGTGGAGAAAGTGTGAGTCCATCAGGCTGGCT
      SP1F 277      RBP2      ETS1 RXR      316
GAGAATTGATCACGAACCTATTGTCTGTAAACTTTTGTATTTCCTGAGACGTGGTTCACAGCAA
      FKHD*      NFAT*
CCCAGGTGCGAACAGCCTTGTGATTCTAGGGTTCT
      ETS1*
PPAR
    
```

Figura 8A



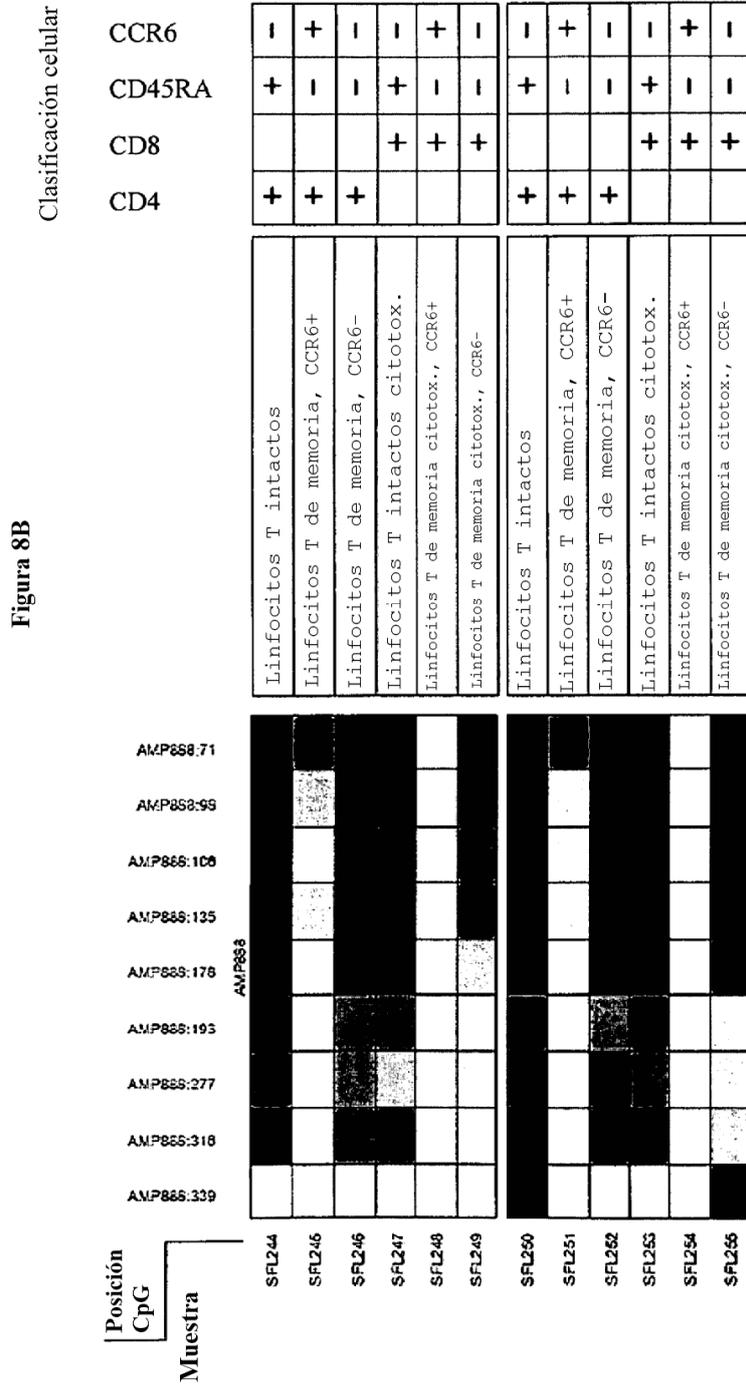


Figura 9

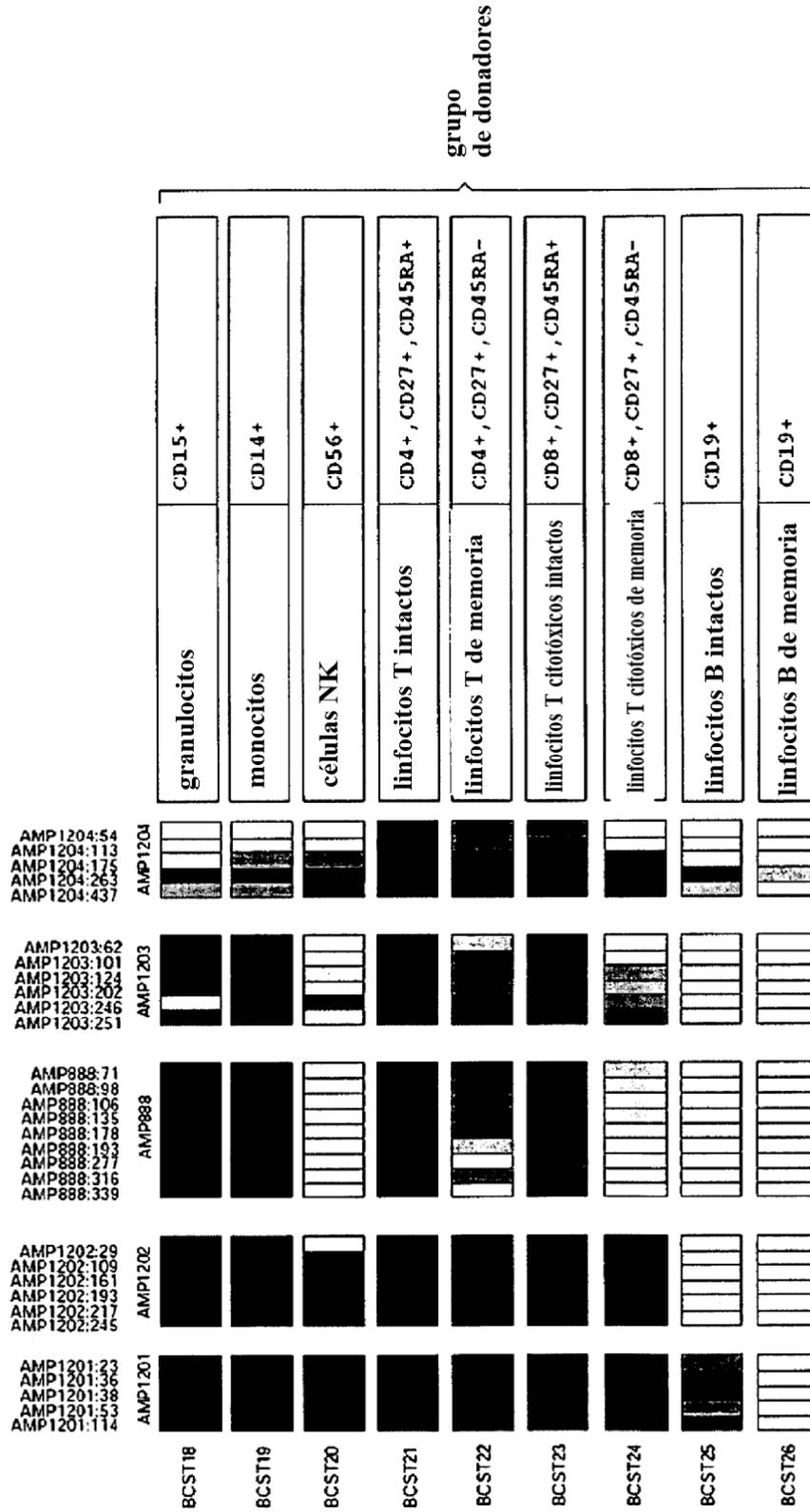


Figura 10

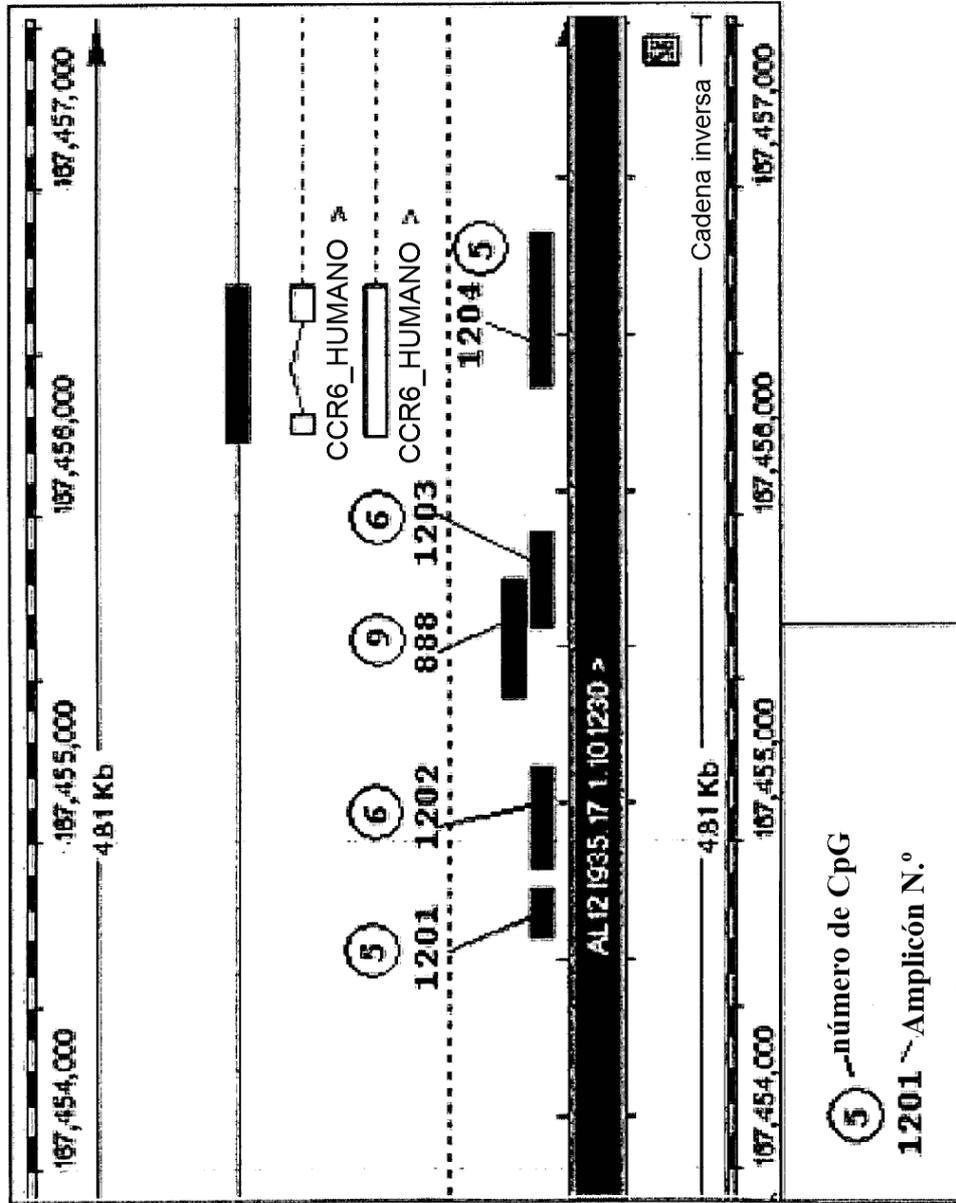


Figura 11

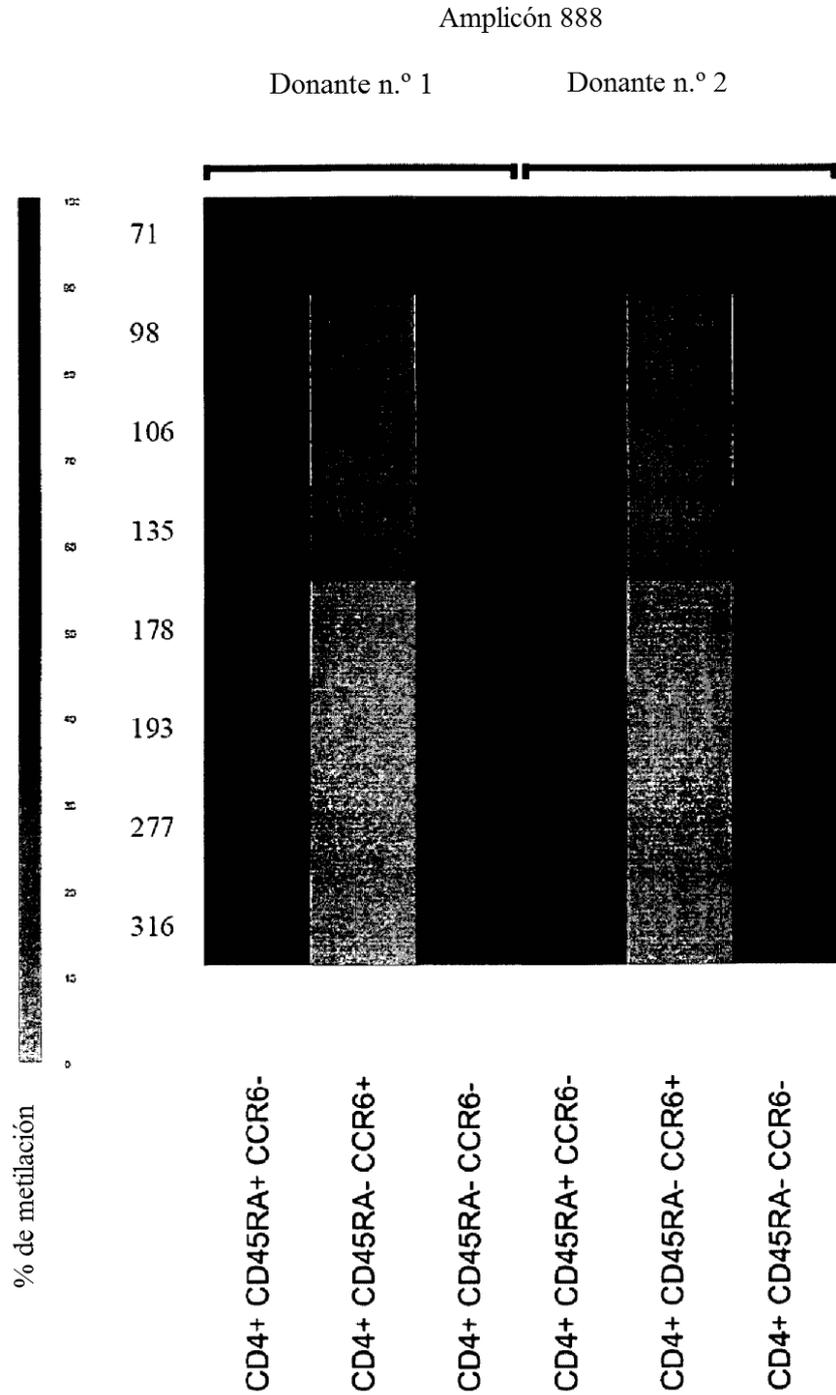


Figura 12

