

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 179**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6881** (2008.01)

**C12Q 1/6883** (2008.01)

**C12Q 1/6886** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2014 E 14196613 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 3029150**

54 Título: **Procedimiento epigenético para la identificación de linfocitos T auxiliares foliculares (THF)**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.01.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**OLEK, SVEN, DR. y  
HOFFMÜLLER, ULRICH, DR.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 695 179 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

Procedimiento epigenético para la identificación de linfocitos T auxiliares foliculares (THF)

La presente invención se refiere a un procedimiento, en particular, un procedimiento *in vitro*, para identificar linfocitos T auxiliares foliculares, que comprende analizar el estado de metilación de al menos una posición CpG en la región génica del mamífero para el factor inhibidor de la leucemia (LIF), en el que una desmetilación de dicha región génica es indicativa de un linfocito T auxiliar folicular, cuando se compara con un linfocito T auxiliar no folicular. Los análisis de acuerdo con la invención pueden identificar linfocitos T auxiliares foliculares a un nivel epigenético y distinguirlos de todas las otras células en muestras complejas, tal como, por ejemplo, otras células sanguíneas. La presente invención proporciona además un procedimiento mejorado para cuantificar linfocitos T auxiliares foliculares en muestras complejas. El procedimiento puede realizarse sin una etapa de purificación y/o enriquecimiento de células, preferentemente en sangre completa y/o tejido no tripsinizado.

Además, la presente invención se refiere al uso de un kit para realizar los procedimientos anteriores. Un objetivo de la presente invención es proporcionar un medio novedoso y más robusto para detectar cuantitativamente y medir los linfocitos T auxiliares foliculares de la sangre dentro de cualquier órgano o tejido sólido o cualquier fluido corporal de un mamífero.

### Antecedentes de la invención

La ayuda de los linfocitos T a los linfocitos B es un aspecto fundamental de la inmunidad adaptativa y la generación de memoria inmunológica. Los linfocitos T auxiliares foliculares de B (también conocidos como linfocitos T auxiliares foliculares o THF), son linfocitos TCD4+ experimentados para antígenos que se encuentran en la periferia dentro de los folículos de linfocitos B de órganos linfoides secundarios tales como nódulos linfáticos, bazo y parches de Peyer, y comúnmente identificados por su expresión constitutiva del receptor CXCR5 de folículo de linfocitos B (Fazilleau y col.; Mark, L; McHeyzer-Williams, LJ; McHeyzer-Williams, MG (marzo de 2009). "Linfocitos T auxiliares foliculares: linaje y ubicación". *Immunity* 30 (3): 324-35).

Los linfocitos T (FH) dependen de la expresión del factor de transcripción regulador principal Bcl6. Otras características distintivas de los linfocitos T (FH) son la expresión de PD-1, SAP (SH2D1A), IL-21 e ICOS, entre otras moléculas, y la ausencia de Blimp-1 (prdm1). Los linfocitos T (FH) son importantes para la formación de centros germinales. Una vez que se forman los centros germinales, se necesitan linfocitos T (FH) para mantenerlos y para regular la diferenciación de linfocitos B del centro germinal en células plasmáticas y linfocitos B de memoria.

Aunque casi todas las células de un individuo contienen exactamente el mismo complemento de código de ADN, los organismos superiores deben imponer y mantener diferentes patrones de expresión génica en los diversos tipos de tejido. La mayoría de la regulación génica es transitoria, según el estado actual de la célula y los cambios en los estímulos externos. La regulación persistente, por otra parte, es un papel principal de la epigenética: patrones regulatorios hereditarios que no alteran la codificación genética básica del ADN. La metilación del ADN es la forma arquetípica de regulación epigenética; sirve como la memoria estable para las células y desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la identidad a largo plazo de diversos tipos de células. Recientemente, se descubrieron otras formas de regulación epigenética. Además de la "quinta base" 5-metilcitosina (mC), se puede encontrar una sexta (5-hidroximetilcitosina, hmC), séptima (5-formilcitosina, fC) y octava (5-carboxicitosina, cC) (Michael J. Booth y col., Secuenciación cuantitativa de 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina en resolución de base única, *Science* 18 de mayo de 2012, vol. 336 n.º. 6083 pág. 934-937).

El objetivo principal de las modificaciones de ADN mencionadas es la secuencia de dos nucleótidos citosina-guanina (un "sitio CpG"); dentro de este contexto, la citosina (C) puede experimentar una modificación química simple para convertirse en formilada, metilada, hidroximetilada o carboxilada. En el genoma humano, la secuencia CG es mucho más rara de lo esperado, excepto en determinados grupos relativamente densos llamados "islas CpG". Las islas CpG se asocian frecuentemente con promotores de genes, y se ha estimado que más de la mitad de los genes humanos tienen islas CpG (Antequera y Bird, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 90: 11995-9, 1993).

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

Para una de las modificaciones descritas recientemente de citosina, 5-hidroximetilación, se demostró la utilidad de la secuenciación por bisulfito oxidativa para mapear y cuantificar 5hmC en islas CpG (Michael J. Booth y col., Secuenciación cuantitativa de 5-metilcitosina e 5-hidroximetilcitosina en resolución de base única, *Science* 18 de mayo de 2012, vol. 336 n.º. 6083 pág. 934-937). Se encontraron altos niveles de 5hmC en islas CpG asociadas con

reguladores transcripcionales y en elementos nucleares intercalados largos. Se sugiere que estas regiones puedan experimentar reprogramación epigenética en células madre embrionarias.

5 Hale JS y *col.* (en: Distintos linfocitos T CD4+ de memoria + linfocitos T con compromiso con linajes de linfocitos T auxiliares foliculares y T auxiliares 1 se generan después de la infección viral aguda. *Inmunidad*. 18 de abril de 2013; 38 (4): 805-17) basada en los perfiles de expresión génica, estudios epigenéticos, y análisis fenotípicos y funcionales encontraron que hay poblaciones distintas de linfocitos T CD4(+) de memoria con compromiso con linajes de linfocitos Tfh o Th1. Las modificaciones epigenéticas del locus de granzima B distinguieron los linfocitos T CD4+ de memoria Tfh de los de memoria Th1.

10 Kashiwakuma y *col.* (en: Atenuador de linfocitos B y T suprime la producción de IL-21 a partir de linfocitos Th foliculares y respuestas inmunes humorales posteriores. *J Immunol*. 2010 Sep 1; 185 (5): 2730-6) desvelan que los linfocitos foliculares Th (Tfh), que son linfocitos T efectores no Th1 y no Th2 que expresan CXCR5 y proporcionan ayuda para que los linfocitos B produzcan Ig, también expresan atenuador de linfocitos (BTLA).

15 El documento WO 02/083162 describe un procedimiento para tratar, inhibir o evitar el rechazo activado por el sistema inmunitario de tejido o células injertadas en un huésped receptor administrando una cantidad farmacéuticamente eficaz de agente inhibidor de linfocitos T CD8+.

20 El documento US 2012-0177597 desvela un procedimiento para promover el desarrollo de linfocitos T auxiliares foliculares (Tfh) que producen IL-21 en un sujeto a partir de linfocitos T CD4+ sup. vírgenes que comprende las etapas de: proporcionar el uno o más linfocitos T CD4+ sup. vírgenes; poner en contacto el uno o más linfocitos T CD4+ vírgenes con una citoquina o una combinación de citoquinas seleccionadas de entre: IL-6/TGF- $\beta$ /IL-12; o IL-12; o TGF- $\beta$  y IL-12; y diferenciar el uno o más linfocitos TCD4+ vírgenes en el uno o más linfocitos Tfh productores de IL-21.

En vista de lo anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento mejorado y en particular robusto basado en el análisis de metilación de ADN como una herramienta superior con el fin de detectar, identificar, discriminar y cuantificar de manera más práctica y confiable a los linfocitos T auxiliares foliculares.

25 La presente invención resuelve el objeto anterior proporcionando un procedimiento para identificar linfocitos T auxiliares foliculares en una muestra, que comprende analizar el estado de metilación de al menos una posición CpG en la región génica del mamífero para el factor inhibidor de la leucemia (LIF), en el que dicha región génica como se analiza se posiciona basándose en/de acuerdo con la SEQ ID NO 1, en el que una desmetilación de dicha región génica es indicativa de un linfocito T auxiliar folicular, cuando se compara con un linfocito T auxiliar no folicular.

30 El factor inhibidor de la leucemia proteica (LIF, o CDF; DIA; HILDA; MLPLI) tiene la capacidad de inducir una diferenciación terminal en las células leucémicas. Sus actividades incluyen la inducción de la diferenciación hematopoyética en células leucémicas normales y mieloides, la inducción de la diferenciación de células neuronales y la estimulación de la síntesis de proteínas en fase aguda en hepatocitos. El gen para LIF humano se encuentra en el cromosoma 22, NC\_000022.11 (30240447... 30257381, complemento).

35 La presente invención se basa además en la sorprendente identificación de una región del gen LIF por los inventores, como marcador epigenético específico, que permite la identificación de linfocitos T auxiliares foliculares, así como la aplicación habitual clínica de dicho análisis.

40 En el contexto de la presente invención, la región genómica de acuerdo con la SEQ ID NO 1 permite la identificación de linfocitos T auxiliares foliculares. Sorprendentemente, el patrón discriminatorio de citosina convertible por bisulfito y no convertible está particular e incluso exclusivamente limitada a la región genómica de acuerdo con la SEQ ID NO 1 para linfocitos T auxiliares foliculares como se muestra usando el amplicón de acuerdo con la SEQ ID NO 1.

45 Los inventores podrían demostrar que en los linfocitos T auxiliares foliculares los motivos CpG están casi completamente desmetilados (es decir, más de 70 %, preferentemente 80 %, preferentemente, más de 90 % y lo más preferente más de 95 %), mientras que los mismos motivos están completamente metilados en todas las demás células inmunes.

50 La metilación diferencial de los motivos CpG dentro de las regiones anteriormente mencionadas es una herramienta valiosa para identificar linfocitos T auxiliares foliculares, tal como se requerirá/o al menos de algún valor para identificar y cuantificar dichas células en enfermedades autoinmunes, rechazos de trasplantes, cáncer, alergia, inmunodeficiencias primarias y secundarias, tal como, por ejemplo, infecciones por VIH y SIDA, injerto contra huésped (GvH), malignidades hematológicas, artritis reumatoide, esclerosis múltiple o un estado inmune relacionado con los linfocitos T citotóxicos en cualquier contexto de diagnóstico visualizable. El ensayo permite la medición de linfocitos T auxiliares foliculares sin purificación ni procedimientos de tinción.

55 Otro aspecto preferente del procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende además una cuantificación de la cantidad relativa de linfocitos T auxiliares foliculares basándose en la comparación de las cantidades relativas de dicha frecuencia de metilación en la región como se analiza con cantidades relativas de la frecuencia de metilación en un gen de control, tal como, por ejemplo, GAPDH. Dicha cuantificación se consigue así

basándose en la relación del ADN convertible por bisulfito a ADN no convertible en la región genética de LIF (de SEQ ID NO 1) como se describe y se analiza en el presente documento. Lo más preferente es una cuantificación de la cantidad relativa de linfocitos T auxiliares foliculares basándose en un análisis (preferentemente paralelo o simultáneo) de la cantidad relativa de ADN convertible por bisulfito de la región celular específica para LIF, y de la cantidad relativa de ADN convertible por bisulfito de genes celulares no específicos (preferentemente designados "genes de control" o "regiones de control", tal como, por ejemplo, el gen de GAPDH).

En una realización preferente adicional del procedimiento de acuerdo con la presente invención, dicho análisis de convertibilidad por bisulfito comprende la amplificación con al menos un cebador de pares de cebadores adecuados que pueden diseñarse adecuadamente basándose en la SEQ ID NO 1, preferentemente oligómeros de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO 2 a 4.

A diferencia de las mediciones de FACS y ARNm, que usan los procedimientos de acuerdo con la presente invención, la(s) medición(es) y análisis pueden realizarse independientemente de la purificación, almacenamiento, y hasta cierto punto, también de la calidad del tejido.

Preferentemente, la amplificación implica una enzima polimerasa, una RCP o reacción de amplificación química, u otros procedimientos de amplificación conocidos por el experto como se describe a continuación, por ejemplo en el contexto de MSP, HeavyMethyl, Scorpion, MS-SNUPE, MethylLight, secuenciación por bisulfito, ensayos de restricción específicos de metilo y/o RCP digital (véase, por ejemplo, Kristensen y Hansen, procedimientos basados en RCP para detectar biomarcadores de metilación de ADN de locus único en diagnósticos de cáncer, pronósticos y respuesta al tratamiento, química clínica 55: 8 1471-1483 (2009)).

Con la amplificación, se produce un amplicón de región del gen LIF que es una "herramienta" particularmente preferente para realizar el(los) procedimiento(s) de acuerdo con la presente invención. En consecuencia, se desvelan oligómeros de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO 2 a 4 o un amplicón como se amplifica por un par de cebadores basados en la SEQ ID NO 2 a 4. Por lo tanto, las secuencias de SEQ ID NO 2 a 4 (y, si es necesario, las secuencias complementarias de las mismas) pueden usarse para diseñar cebadores para amplificaciones, es decir, sirven como "balizas" en la secuencia según sea relevante. De forma similar, se pueden diseñar cebadores adicionales basados en el amplicón de acuerdo con la SEQ ID NO 1. La amplificación puede tener lugar en la secuencia de ADN genómica y/o de bisulfito (es decir, "convertida").

El experto también podrá seleccionar subconjuntos específicos de posiciones CpG con el fin de minimizar la cantidad de sitios a analizar, por ejemplo al menos uno de la posición CpG seleccionada de una posición CpG en un amplicón de acuerdo con la SEQ ID NO 1, y se selecciona preferentemente de entre las posiciones CpG 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23 en el amplicón n. ° 2305 de acuerdo con la SEQ ID NO 1. Las posiciones se cuentan numéricamente desde el extremo 5' de un amplicón como se genera y analiza. Se prefieren combinaciones de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 posiciones, cuyo análisis produce datos e/o información suficientes para ser informativo en el contexto de la presente invención.

El experto también podrá seleccionar subconjuntos específicos de posiciones CpG con el fin de minimizar la cantidad de sitios a analizar, por ejemplo, al menos una de las posiciones CpG 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y/o 20 en el amplicón n. ° 2305 de la región convertible de bisulfito específico de LIF (SEQ ID NO 1), o todos los sitios como están presentes en la región convertible de bisulfito de acuerdo con la SEQ ID NO 1.

Con el fin de analizar la convertibilidad por bisulfito de las posiciones CpG, se puede usar cualquier procedimiento conocido para analizar la metilación del ADN. En una realización preferente del procedimiento de acuerdo con la presente invención, el análisis del estado de metilación comprende un procedimiento seleccionado de entre digestiones enzimáticas específicas de metilación, secuenciación por bisulfito, análisis seleccionado de entre metilación del promotor, metilación de isla CpG, MSP, HeavyMethyl, MethylLight, Ms-SNUPE u otros procedimientos que dependen de una detección de ADN amplificado. Estos procedimientos son bien conocidos por el experto, y se pueden encontrar en la literatura respectiva.

En una realización preferente del procedimiento de acuerdo con la presente invención, dicho procedimiento es adecuado para la aplicación habitual, por ejemplo en un chip de ADN. Basándose en la información anterior y en la literatura respectiva, el experto podrá ajustar el procedimiento anterior a dichos ajustes.

En otra realización preferente más de los procedimientos de acuerdo con la presente invención, dicho procedimiento se realiza sin una etapa de purificación y/o enriquecimiento de dichas células a identificar, preferentemente usando sangre completa y/o tejido no tripsinizado.

En otra realización preferente del procedimiento de acuerdo con la presente invención, la identificación comprende una distinción de dichos linfocitos T auxiliares foliculares de todos los principales tipos de células sanguíneas periféricas y/o células no sanguíneas, preferentemente, pero sin limitación, linfocitos B, linfocitos T citotóxicos, granulocitos, monocitos, linfocitos NK y linfocitos T auxiliares, y otros tipos de células procedentes de otros órganos además de la sangre.

En otra realización preferente más del procedimiento de acuerdo con la presente invención, la muestra se selecciona

de un fluido corporal de mamífero, que incluye muestras de sangre humana, o un tejido, órgano o una muestra de leucocitos o una fracción purificada o separada de dicho tejido, órgano o leucocitos o una muestra de tipo celular. Preferentemente, dicho mamífero es un ratón, rata, mono o humano. Las muestras se pueden agrupar adecuadamente, si es necesario.

5 Otro aspecto preferente del procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende además la etapa de decidir sobre el estado inmune de dicho mamífero basándose en dichos linfocitos T auxiliares foliculares. Los linfocitos T auxiliares foliculares pueden cuantificarse y usarse como punto de referencia para cuantificar relativamente más subpoblaciones detalladas (como, pero sin limitación, CD4, Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Treg), o puede usarse como predictivo y/o detección y/o diagnóstico y/o pronóstico y/o factor de detección de eventos adversos, o puede usarse para detectar finalmente esta población para determinar el estado global de la actividad inmune.

10 En otra realización preferente más de los procedimientos de acuerdo con la presente invención, el mamífero padece o es probable que padezca enfermedades autoinmunes, rechazos de trasplantes, enfermedades infecciosas, cáncer, y/o alergia como, pero sin limitación, infección por *Trypanosoma cruzi*, malaria e infección por VIH; malignidades hematológicas como, pero sin limitación, leucemia mielógena crónica, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, injerto contra huésped y enfermedad de huésped contra injerto, micosis fungoide, linfoma extranodal de linfocitos T, linfomas cutáneos de linfocitos T, linfoma anaplásico de células grandes, linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T y otros de linfocito T, linfocitos B y neoplasias de linfocitos NK, deficiencias de linfocitos T tales como pero sin limitación, linfocitopenia, inmunodeficiencia combinada grave (SCID), síndrome de Omenn, hipoplasia de cartílago-pelo, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y afecciones hereditarias como el síndrome de DiGeorge (DGS), síndromes de rotura cromosómica (CBS), esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica, dermatomiositis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, psoriasis, vitiligo, penfigoide ampoloso, alopecia areata, miocardiopatía dilatada idiopática, diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, miastenia gravis, nefropatía IgA, nefropatía membranosa y anemia perniciosa; y trastornos combinados de linfocitos B y linfocitos T tales como, pero sin limitación, ataxia telangiectasia (AT) y síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS); y carcinomas tales como, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, melanoma y cáncer de cabeza y cuello.

20 Otro aspecto preferente del procedimiento de acuerdo con la presente invención se refiere a un procedimiento como el anterior, que comprende además medir y/o monitorizar la cantidad de linfocitos T auxiliares foliculares en respuesta a sustancias químicas y/o biológicas que se proporcionan a dicho mamífero, es decir en respuesta a un tratamiento de dicho paciente. Dicho procedimiento comprende las etapas anteriores y comparar dicha cantidad relativa de dichas células como se identifica con una muestra tomada anteriormente o en paralelo del mismo mamífero, y/o una muestra de control. Basándose en los resultados proporcionados por el(los) procedimiento(s) de la invención, el médico tratante podrá decidir sobre el estado inmune del paciente, y ajustar un tratamiento de la enfermedad subyacente en consecuencia.

30 Preferentemente, dicho procedimiento se realiza sin una etapa de purificación y/o enriquecimiento de células, preferentemente en sangre completa y/o tejido no tripsinizado, o en cualquier otra muestra biológica que potencialmente contenga dichos linfocitos T auxiliares foliculares como, por ejemplo, una muestra para transferir células a un paciente.

Otro aspecto preferente del procedimiento de acuerdo con la presente invención se refiere a un procedimiento como el anterior, que comprende además formular dichos linfocitos T auxiliares foliculares como se identifica para trasplante en un paciente. Las preparaciones farmacéuticas para estos fines y los procedimientos para su producción se realizan de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica de la medicina de trasplantes.

45 Otro aspecto preferente más de la presente invención se refiere al uso de un kit que comprende a) un reactivo de bisulfito, y b) materiales para el análisis del estado de metilación de las posiciones CpG seleccionadas de entre las posiciones CpG en la región de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, tal como un oligómero seleccionado de entre las secuencias de acuerdo con las SEQ ID NO: 2 a 4 para identificar, cuantificar, y/o monitorizar linfocitos T auxiliares foliculares en un mamífero basándose en el análisis de la accesibilidad por bisulfito de las posiciones CpG en región génica de LIF.

La presente invención también abarca el uso de oligómeros o amplicones de acuerdo con la presente invención para identificar y/o monitorizar linfocitos T auxiliares foliculares en un mamífero como se describe en el presente documento.

55 Como se ha mencionado anteriormente, recientemente se descubrieron tres nuevas modificaciones de citosina. Por lo tanto, se espera que los hallazgos científicos futuros corrijan los patrones epigenéticos de modificación descritos en el pasado. Estos patrones pasados de modificación de citosina abarcan citosina convertible por bisulfito (no metilada, no modificada) y no convertible (metilada, modificada). Ambos términos deben corregirse, como se describe. De acuerdo con los hallazgos científicos novedosos (i) la citosina convertible no bisulfito abarca 5-metilcitosina (mC) y 5-hidroximetilcitosina (hmC), y (ii) la citosina convertible por bisulfito (es decir, la convertibilidad

por bisulfito) abarca 5-formilcitosina (fC ), 5-carboxicitosina (cC), así como citosina no modificada.

Además, las invenciones pasadas se basan en (i) la relación de citosina convertible por bisulfito a cantidad total de cromatina (locus de ADN convertible 100 % por bisulfito de tipo celular independiente) o (ii) en la relación de citosina convertible por bisulfito (fC, cC, citosina no modificada) a citosina convertible sin bisulfito (hmC y mC). Estas relaciones caracterizan el tipo de célula, la diferenciación celular, la etapa celular así como las etapas celulares patológicas. Por lo tanto, las nuevas técnicas darán como resultado relaciones novedosas y más específicas y podrían complementar el estado celular específico de células específicas, así como los patrones patológicos de las modificaciones epigenéticas y, por lo tanto, definir potenciales novedosos biomarcadores. Las relaciones novedosas que deben descubrirse como biomarcadores se pueden definir como:

10 Relación de biomarcadores = a/b

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

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

en las cuales a y b difieren entre sí en una a cuatro tipos de modificaciones. El descubrimiento de novedosas modificaciones de ADN ampliará esta enumeración.

15 Para el fin de la definición de la presente solicitud, "modificaciones epigenéticas" en la secuencia de ADN se refiere a mediante la terminología de (i) citosina convertible por bisulfito (5-formilcitosina, (fC) y/o 5-carboxicitosina (cC)) y (ii) citosina convertible sin bisulfito (que incluye 5-metilcitosina (mC) y 5-hidroximetilcitosina, (hmC)). Dado que ambos tipos de metilación, mC y hmC, no son convertibles por bisulfito, no es posible distinguir entre estas dos. Asimismo, fC, cC así como la citosina no modificada son convertibles por bisulfito y tampoco pueden distinguirse entre sí. La expresión ADN "metilado" abarca mC así como hmC. La expresión ADN "no metilado" abarca fC, cC, y ADN no modificado. Se espera que las variantes novedosas de las modificaciones de ADN se descubran en el futuro. Cada tipo de modificación será convertible por bisulfito o no. Sin embargo, dado que el presente procedimiento distingue de forma fiable entre los dos grupos, estas novedosas modificaciones también serán utilizables como marcadores.

25 Además, aparte de las modificaciones del ADN, también las histonas experimentan modificaciones postraduccionales que alteran su interacción con el ADN y las proteínas nucleares. Las modificaciones incluyen metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, citrulinación y ADP-ribosilación. El núcleo de las histonas H2A, H2B y H3 también se puede modificar. Las modificaciones de histonas actúan en diversos procedimientos biológicos, como la regulación de genes, la reparación del ADN, la condensación cromosómica (mitosis) y la espermatogénesis (meiosis). También para estas modificaciones, un patrón específico de modificación es específico para diferentes tipos de células, etapas celulares, estado de diferenciación y dicho patrón puede analizarse para la convertibilidad por bisulfito o procedimientos similares con el fin de identificar determinadas células y etapas celulares. La presente invención también abarca un uso de estas modificaciones.

35 En resumen, usando la región genética LIF y en particular el amplicón como se describe en el presente documento como un marcador, los inventores identificaron muy específicamente, cuantificaron y particularmente diferenciaron linfocitos T auxiliares foliculares, y en su relación con otros tipos de células en una muestra, por ejemplo para linfocitos T globales.

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

40 La Figura 1 muestra la ubicación cromosómica del gen LIF (factor inhibidor de la leucemia) - ENSG00000128342 en el cromosoma 22: cadena inversa 30.240.447-30.246.851 y la ubicación del amplicón AMP2305 de acuerdo con la invención en la región genética de LIF.

45 La Figura 2 muestra el análisis de sitios CpG en el amplicón n.º 2305. Los recuadros horizontales en la tabla corresponden a las posiciones CpG en el amplicón como se analiza (por ejemplo, CpG 1, 2, etc.), y las columnas corresponden a los tipos de células como se analiza. Las abreviaturas en la parte inferior indican citotox. = citotóxico; linfocitosT auxiliares act.= linfocitos T auxiliares activados; o TFH (peri) = linfocitos T auxiliares foliculares (periféricos), para identificar linfocitos T auxiliares foliculares, respectivamente.

La SEQ ID NO 1 muestra la secuencia genómica del amplicón AMP2305.

La SEQ ID NO 2 a SEQ ID NO 4 muestran las secuencias de oligómeros específicos.

## 50 **Ejemplos**

### **Ejemplo 1**

Con el fin de identificar linfocitos TFH (linfocitos T auxiliares foliculares), se realizó la RCPc en muestras convertidas por bisulfito procedentes de la región genómica humana de acuerdo con la siguiente secuencia (AMP2305, SEQ ID NO 1):

ES 2 695 179 T3

Cebador directo	q2305_TFH_dir	GTTTAATGTTATTGTTGATATTTTGT (SEQ ID NO 2)
Cebador inverso	q2305_TFH_inv	ACATCCACATAACCCACA (SEQ ID NO 3)

CTTCTGCCCCTCAGTACACAGCCCAGGGGGAGCCGTTCCCCAACAACTGGACAA  
GCTATGTGGCCCCAACGTGACGGACTTCCCGCCCTTCCACGCCAACGGCACGGAG  
AAGGCCAAGCTGGTGGAGCTGTACCGCATAGTCGTGTACCTTGGCACCTCCCTGG

GCAACATCACCCGGGACCAGAAGATCCTCAACCCAGTGCCCTCAGCCTCCACAG  
CAAGCTCAACGCCACCGCCGACATCCTGCGAGGCCTCCTTAGCAACGTGCTGTGC  
CGCCTGTGCAGCAAGTACCACGTGGGCCATGTGGACGTGACCTACGGCCCTGACA  
CCTCGGGTAAGGATGTCTTCCAGAAGAAGAAGCTGGGCTGTCAACTCCTGGGGA  
AGTATAAGCAGATCATCGCCGTGTTGGCCCAGGCCTTCTAGCAGGAGGTCTTGAA  
GTGTGCTGTGAACCGAGGGATCTCAGGAGTTGGGTCCAGATGTGGGGGCCTGTCC  
AA

Los siguientes cebadores y sonda se usaron para la RCPc:

Sonda q2305_TFH_P_nm TGTGTTGTGTTGTTTGTGTAGTAAGTATTAT (SEQ ID NO 4)
--

La especificidad del tipo de célula (medida por RCPc) se encontró de la siguiente manera:

Tipo de células sanguíneas inmunes	Caracterización FACS	Tejido	Porcentaje de linfocitos THF (%)
TFH06 (control)	CD3+, CD4 + CD45RA -, PD1++, CXCR5+	amígdala	95,03
linfocitos T auxiliares activados	CD4 + CD69 +, PD1-(TFH-)	amígdala	85,39
linfocitos T citotóxicos activados	CD8 + CD69 +, PD1-(TFH-)	amígdala	15,84
pTFH01 (TFH perif.)		Sangre periférica	94,79
pTFH02 (TFH perif.)		Sangre periférica	74,91
pTFH03 (TFH perif.)		Sangre periférica	73,82
pTFH04 (TFH perif.)		Sangre periférica	73,95
pTFH05 (TFH perif.)		Sangre periférica	91,81
pTFH06 (TFH perif.)		Sangre periférica	90,23
Granulocitos	CD15+	Sangre periférica	0,01
Linfocitos T citotóxicos totales	CD3+, CD8+	Sangre periférica	0,83

(continuación)

Tipo de células sanguíneas inmunes	Caracterización FACS	Tejido	Porcentaje de linfocitos THF (%)
Linfocitos T auxiliares totales	CD3+, CD4+	Sangre periférica	23,41
Linfocitos NK	CD3, CD56+	Sangre periférica	0,53
monocitos	CD14+	Sangre periférica	0,00
Linfocitos CD4+ vírgenes	CD4+, CD45RA+, CCR7+	Periferia	0,12
Linfocitos CD4+ efectores de memoria terminales diferenciales	CD4+, CD45RA+, CCR7-	Periferia	62,94
Linfocitos CD4+ de memoria centrales	CD4+, CD45RA-, CCR7+	Periferia	26,65
Linfocitos CD4+ de memoria efectores	CD4+, CD45RA-, CCR7-	Periferia	57,18

En las mediciones RCPc de sangre completa, se determinó/cuantificó la siguiente cantidad de linfocitos TFH. Las muestras son sangre periférica completa de un total de 11 donantes diferentes (sanos):

Muestra	Número de copias de TFH desmetilados (LIF, SEQ ID NO 1)	Número de copias de TFH metilados (LIF, SEQ ID NO 1)	Linfocitos THF (%)
1	351,0	15166,7	2,26
2	260,7	16300,0	1,57
3	209,0	6680,0	3,03
4	234,7	11400,0	2,02
5	645,3	16500,0	3,76
6	462,7	14133,3	3,17
7	520,0	13633,3	3,67
8	595,7	12800,0	4,45
9	401,0	16600,0	2,36
10	339,7	14066,7	2,36
11	249,3	14500,0	1,69
Valor medio			2,78

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Epiontis GmbH  
 <120> Procedimiento epigenético para la identificación de linfocitos T auxiliares foliculares (TFH-)  
 <130> E31776EP  
 <160> 4  
 <170> PatentIn versión 3.5
- 10 <210> 1  
 <211> 496



ES 2 695 179 T3

<212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1

```

cttctgcccc tcagtacaca gccaggggg agccgttccc caacaacctg gacaagctat      60
gtggcccca cgtgacggac ttcccgcct tccacgcaa cggcacggag aaggccaagc      120
tggtggagct gtaccgcata gtcgtgtacc ttggcacctc cctgggcaac atcaccoggg      180
accagaagat cctcaacccc agtgccctca gcctccacag caagctcaac gccaccgccc      240
acatcctgcg aggcctcctt agcaacgtgc tgtgcccgcct gtgcagcaag taccacgtgg      300
gccatgtgga cgtgacctac ggccctgaca cctcgggtaa ggatgtcttc cagaagaaga      360
agctgggctg tcaactcctg gggaagtata agcagatcat cgccgtgttg gcccaggcct      420
tctagcagga ggtcttgaag tgtgctgtga accgagggat ctcaggagtt ggggccagat      480
gtgggggcct gtccaa      496
  
```

5 <210> 2  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 2  
 gtttaatggt attgtgata tttgt 26

<210> 3  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 3  
 acatccacat aaccaca 18

20 <210> 4  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

<400> 4  
 tgtgtgtgt tgtttgtga gtaagtatta t 31

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento de identificación de linfocitos T auxiliares foliculares en una muestra, que comprende analizar el estado de metilación de al menos una posición CpG en la región génica del mamífero para el factor inhibidor de la leucemia (LIF), en el que dicha región génica analizada se posiciona basándose en/de acuerdo con la SEQ ID NO 1, en el que una desmetilación de dicha región génica es indicativa de un linfocito T auxiliar folicular, cuando se compara con un linfocito T auxiliar no folicular.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha al menos una posición CpG está presente en la región 5' corriente arriba del inicio de la transcripción, región promotora, las regiones 5' o 3' no traducidas, exón, intrón, borde exón/intrón y/o en la región 3' corriente abajo de la parada transcripcional de dicho gen analizada.
- 10 3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha al menos una posición CpG se selecciona de una posición CpG en un amplicón de acuerdo con la SEQ ID NO 1, y se selecciona preferentemente de entre las posiciones CpG 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23 en el amplicón n. ° 2305 de acuerdo con la SEQ ID NO 1.
- 15 4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho análisis de la convertibilidad por bisulfito comprende un procedimiento seleccionado de entre digestión enzimática específica de metilación, secuenciación por bisulfito, un análisis seleccionado de entre metilación del promotor, metilación de isla CpG, MSP, HeavyMethyl, MethylLight, Ms- SNUPE, y otros procedimientos que dependen de una detección de ADN amplificado.
- 20 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una cuantificación de la cantidad relativa de linfocitos T auxiliares foliculares basándose en la comparación de las cantidades relativas de dicha frecuencia de metilación en la región analizada con cantidades relativas de la frecuencia de metilación en un gen de control, tal como, por ejemplo, GAPDH.
- 25 6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha muestra se selecciona de un fluido corporal de mamífero, que incluye muestras de sangre humana, o un tejido, órgano o muestra de sangre de tipo celular, una muestra de linfocitos sanguíneos o una fracción de los mismos.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una distinción de dichos linfocitos T auxiliares foliculares de todos o al menos uno de los tipos de células seleccionadas de entre, linfocitos B, linfocitos T citotóxicos, granulocitos, monocitos, linfocitos NK y linfocitos T auxiliares.
- 30 8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho procedimiento se realiza sin una etapa de purificación y/o enriquecimiento de dichas células a identificar, preferentemente usando sangre completa y/o tejido no tripsinizado.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además la etapa de decidir sobre el estado inmune de dicho mamífero basándose en dichos linfocitos T auxiliares foliculares identificados.
- 35 10. Un procedimiento para monitorizar el nivel de linfocitos T auxiliares foliculares en un mamífero, que comprende realizar el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, y comparar dicha cantidad relativa de dichas células identificada con una muestra tomada anteriormente o en paralelo del mismo mamífero, y/o una muestra de control.
- 40 11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además medir y/o monitorizar la cantidad de dichos linfocitos T auxiliares foliculares en respuesta a sustancias químicas y/o biológicas que se proporcionan a dicho mamífero.
12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho mamífero padece o es probable que padezca enfermedades autoinmunes, rechazos de trasplantes, enfermedades infecciosas, cáncer y/o alergia.
- 45 13. Uso de un kit que comprende a) un reactivo de bisulfito, y b) materiales para el análisis del estado de metilación de las posiciones CpG seleccionadas de entre las posiciones CpG en la región de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, tal como un oligómero seleccionado de entre las secuencias de acuerdo con las SEQ ID NO: 2 a 4 para identificar, cuantificar, y/o monitorizar linfocitos T auxiliares foliculares en un mamífero basándose en el análisis de la accesibilidad por bisulfito de las posiciones CpG en la región génica de LIF de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.
- 50 14. El uso de un oligómero de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO 2 a 4 o el amplicón de acuerdo con la SEQ ID NO 1 para identificar, cuantificar, y/o monitorizar linfocitos T auxiliares foliculares en un mamífero basándose en el análisis del estado de metilación de las posiciones CpG en una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 4.

Figura 1

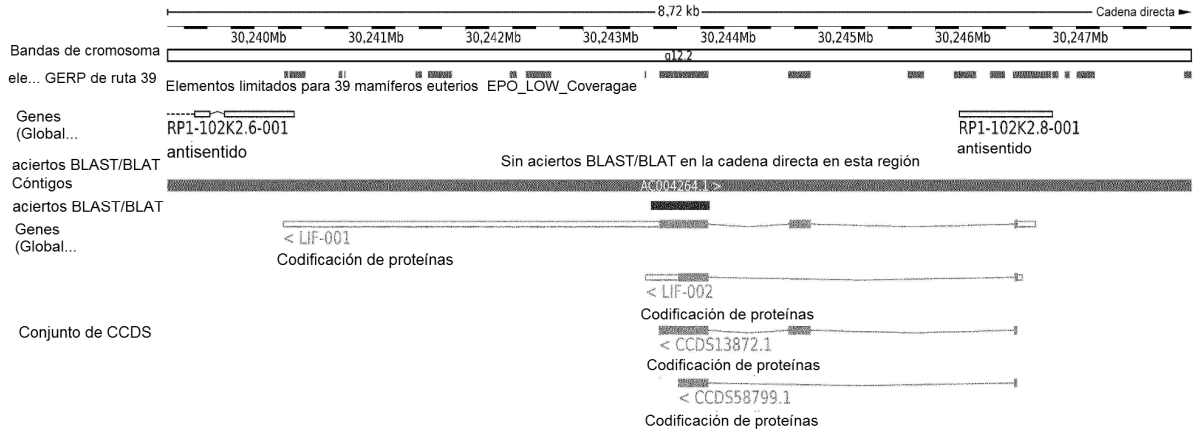


Figura 2

