

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 790**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2012 PCT/EP2012/070676**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13057202**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2012 E 12775244 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2768975**

54 Título: **Marcador epigenético para la identificación de linfocitos T il17 positivos en muestras complejas**

30 Prioridad:

18.10.2011 GB 201117904

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

19.02.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**OLEK, SVEN y
BARON, UDO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 700 790 T3

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

DESCRIPCIÓN

Marcador epigenético para la identificación de linfocitos T il17 positivos en muestras complejas

La presente invención se refiere a un procedimiento para identificar y cuantificar linfocitos T CD4 positivos IL-17 positivos en una muestra de sangre y/o tejido obtenida de un mamífero, que comprende a) analizar el estado de metilación de al menos una posición CpG en el gen IL-17A, en el que dicho análisis comprende una amplificación con un par de cebadores seleccionados de las SEQ ID NO: 18 y 19 como primer cebador; y las SEQ ID NO: 20 y 21 como segundo cebador, en el que una desmetilación de al menos una posición de dicha CpG en dicha muestra cuando se compara con una posición análoga en una célula sanguínea no IL-17 es indicativo de un linfocito T CD4 positivo IL-17 positivo, y b) cuantificar la cantidad de linfocitos T CD4 positivos IL-17 positivos basándose en dicho análisis en la etapa a). La presente invención proporciona además un procedimiento mejorado para cuantificar linfocitos T IL17 positivos en muestras complejas basado en una comparación de la metilación de IL17A con una metilación de al menos un marcador seleccionado del grupo de CD3, FOXP3 y/o GAPDH. El procedimiento puede realizarse sin una etapa de purificación y/o enriquecimiento de células, preferentemente en sangre completa y/o tejido no tripsinado.

15 Antecedentes de la invención

Los linfocitos T auxiliares 17 (Th17) son un subconjunto de linfocitos T auxiliares que producen interleucina 17 (IL-17) descubierta en 2007. Se considera que son distintos a los linfocitos Th1 y Th2 desde el punto de vista del desarrollo y se cree que cantidades excesivas de linfocitos desempeñan un papel clave en las enfermedades autoinmunitarias (Stockinger B, Veldhoen M (junio de 2007). "Differentiation and function of Th17 T cells". Current Opinion in Immunology 19 (3): 281-286) tal como la esclerosis múltiple (que anteriormente se pensaba que era causada por linfocitos Th1), pero también la psoriasis, la uveítis autoinmunitaria, la diabetes juvenil, la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn.

Los linfocitos Th17 producen principalmente dos miembros principales de la familia IL-17, IL-17A e IL-17F, que están involucrados en el reclutamiento, activación y migración de neutrófilos. Estos linfocitos también secretan IL-21 e IL-22. Recientemente, se ha demostrado que los linfocitos polarizados Th17 median la regresión de tumores establecidos en ratones (Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y y col. (November 2009). "T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity". Immunity 31 (5): 787-798).

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 reguladores hereditarios que no alteran la codificación genética básica del ADN.

Como se explica a continuación, una forma de modificación epigenética es la unión de grupos metilo a la base citosina. Sin embargo, 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., Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution Science 18 de Mayo de 2012, vol. 336 n.º. 6083 pág. 934-937). Tanto, la 5-metilcitosina como la 5-hidroximetilcitosina no son convertibles con bisulfito.

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. Las diana principal de la metilación 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, 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 SciUSA. 90, 11995-9, 1993).

En este punto, hay un cambio muy abrupto de la metilación del ADN en la biología de los Treg. Por lo tanto, uno podría incluir una frase puente como: Se ha demostrado que los distintos tipos de células muestran un patrón de metilación de ADN único y característico, es decir, una huella dactilar epigenética que puede explotarse para la identificación y cuantificación de tipos de células (DNA methylation analysis as a tool for cell typing. Baron U, Türbachova I, Hellweg A, Eckhardt F, Berlin K, Hoffmuller U, Gardina P, Olek S. Epigenetics. 2006 Jan-Mar;1(1):55-60. Epub 2006 Feb 25.). Además, los linfocitos T reguladores, que establecen tolerancia para los autoantígenos pero que permiten respuestas inmunitarias contra contrarios, se caracterizaron por ser desmetilados exclusivamente en el gen FOXP3, un factor de transcripción maestro fundamental para la diferenciación y función de los Treg (Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang HD, Bopp T, Schmitt E, Klein-Hessling S, Serfling E, Hamann A, Huehn J. PLoS Biol. 2007 Feb;5(2):e38.; DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, Thiel A, Boeld TJ, Hoffmann

P, Edinger M, Türbachova I, Hamann A, Olek S, Huehn J. Eur J Immunol. 2007 Sep;37(9):2378-89.)

5 La transferencia adoptiva de los Treg expandidos *in vitro* es una opción de tratamiento prometedora para enfermedades autoinmunitarias así como para las inducidas por aloantígenos. Sin embargo, las preocupaciones sobre la estabilidad fenotípica y funcional de los Treg en el cultivo *in vitro* requieren tanto una selección cuidadosa de la población inicial como una caracterización completa del producto celular final.

10 Recientemente, se ha descrito un alto grado de plasticidad del desarrollo para linfocitos Treg y Th17 murinos. De forma similar, se han detectado células FOXP3(+) productoras de IL-17 en la subpoblación de tipo de memoria CD45RA (-) de Treg humanos *ex vivo*. Esto llevó a la investigación de la predisposición de los Treg humanos naturales y de memoria a desarrollarse en linfocitos Th17 durante la expansión policlonal *in vitro*. La desmetilación del ADN inducida por estimulación de RORC, que codifica el factor de transcripción de definición de línea para linfocitos Th17, se produce selectivamente en Treg de tipo de memoria CD45RA(-), independientemente de su nivel de expresión de FOXP3. Por el contrario, los Treg CD45RA (+) naturales retienen la metilación de CpG estable a través del locus RORC incluso después de una expansión *ex vivo* prolongada y, en consecuencia, muestran solo una tendencia marginal a expresar RORC y desarrollarse en células productoras de IL-17 (Schmidl C, Hansmann L, Andreesen R, Edinger M, Hoffmann P, Rehli M. Epigenetic reprogramming of the RORC locus during *in vitro* expansion is a distinctive feature of human memory but not naive Treg. Eur J Immunol. Mayo de 2011;41(5):1491-8. Epub 12 de Febrero de 2011).

20 Se piensa comúnmente que la cuantificación de las células inmunitarias es relativamente fácil y está completamente estandarizada, ya que las células no matriciales no adherentes en la sangre periférica pueden marcarse con anticuerpos y cuantificarse por citometría de flujo. Siempre que las células no sean adherentes, se encuentren suspensiones de células individuales, antígenos de superficie específicos intactos y de tipo celular, la citometría de flujo es de hecho una herramienta de cuantificación celular altamente precisa.

Sin embargo, para muchas aplicaciones en investigación y rutina médica, los requisitos previos mencionados para tales mediciones precisas no se dan:

- 25 1. A menudo, el material/las muestras medidas no derivan de sangre periférica y, por lo tanto, no se cumplen las propiedades de solubilidad y suspensión de células individuales. Esto es válido, por ejemplo, para todos los análisis de biopsias, como los que se realizan en la rutina patológica.
- 30 2. Incluso si el analito es sangre periférica, el requisito previo de tener células intactas es difícil de cumplir, ya que, para mantener su integridad estructural ("intacta"), estas células no deben congelarse ni almacenarse como sangre con EDTA durante más de 6 horas, antes de que las subfracciones, tal como los granulocitos comiencen a desintegrarse.
- 35 3. A diferencia de la percepción común, no hay antígenos (superficie) altamente específicos para todos los tipos de células inmunitarias y, por lo tanto, la identificación de tipos de células no es tan inequívoca como se podría esperar.
- 3a. Debido a que la expresión de antígenos no es un proceso digital, los umbrales deben definirse para decidir, si las células pertenecen a la fracción positiva o negativa. Para los linfocitos T, este problema es particularmente aparente:

40 Por lo tanto, para muchas aplicaciones, los enfoques procedimentales actuales para una determinación cuantitativa de células inmunitarias siguen siendo problemáticos, tal como para las pruebas de rutina en aplicaciones clínicas, que generalmente requieren algunos tiempos de demora y, por lo tanto, resistencia y estabilidad del analito. Como se dice, los procedimientos de citometría de flujo utilizados para la medición de células en sangre periférica no son adecuados para las células inmunitarias que se infiltran en otros tejidos, incluidos los tejidos sólidos durante el desarrollo del tumor o en/después de la inflamación. Por lo tanto, los procedimientos de citometría de flujo no se aplican en estas áreas y los procedimientos sustitutos (en su mayoría histoquímica inmunitaria) son a lo sumo procedimientos semicuantitativos.

45 Para el fin de la definición de la presente solicitud, las modificaciones epigenéticas en la secuencia de ADN se refieren a la terminología de la metilación del ADN (5-metilcitosina (mC), 5-hidroximetilcitosina, (hmC), 5-formilcitosina, (fC) y o 5-carboxicitosina (cC)). Tanto, al menos, la 5-metilcitosina como la 5-hidroximetilcitosina no son convertibles con bisulfito y no se pueden distinguir a través del análisis de conversión con bisulfito.

50 En la literatura científica, el estado de la metilación a menudo se muestra como "hiper" (superior, más de lo normal, (lat.: super)) o "hipo" (inferior, menos de lo normal, (lat.:sub) metilación. En opinión del inventor, estos términos son inapropiados, ya que sugieren una variación del estado "normal". Sin embargo, para las células sanas, no existe algo que no sea normal, ya que para un tipo celular, es normal que esté metilado mientras que para otro, que no esté metilado.

55 Ambas firmas son perfectamente normales. Para el inventor, las regiones genéticas son, por lo tanto, metiladas o no metiladas (también y equivalentes a no metiladas: desmetiladas). La decisión potencial en cuanto a si una región en un tipo celular está aberrantemente metilada (hipermetilada) o aberrantemente desmetilada (hipometilada) puede potencialmente desempeñar un papel en ciertas enfermedades y la decisión se puede tomar basándose en esto. Sin embargo, no es un asunto que se discuta o se encuentre en el procedimiento técnico de medición del estado de

metilación en el ADN. A pesar de esto y debido a las reglas generales, cada vez que se escribe hipermetilación e hipometilación, se piensa que indica la clasificación técnica de desmetilación y metilación.

La secuencia de referencia NCBI: NC_000006.11 desvela el cromosoma 6, incluida la región genómica para IL17A humana (cromosoma 6: la posición para el ARNm es 52,051,185-52,055,436 en la cadena directa).

5 Los presentes inventores presentan un marcador que puede usarse para la identificación y cuantificación de linfocitos T IL17 positivos en un enfoque alternativo cuantitativo, más eficaz, fuerte e integral: el análisis de marcadores epigenéticos de tipo celular o estado específico de la célula (metilación del ADN y/o estructura de la cromatina y/o inercia química del ADN). En la rutina clínica y en la práctica biológica celular general, la identificación de marcadores epigenéticos específicos facilitará enormemente la medición de los tipos de células sanguíneas e inmunitarias.

10 Janson y col. (in Janson PC, Linton LB, Bergman EA, Marits P, Eberhardson M, Piehl F, Malmström V, Winqvist O. Profiling of CD4+ T cells with epigenetic immune lineage analysis. J Immunol. 1 de enero de 2011; 186(1):92-102. Epub 3 de diciembre de 2010.) describe un procedimiento para identificar la ubicación de linfocitos T CD4(+) humanos aislados en cualquier eje efector de linfocitos T en función de la metilación de CpG específica de citoquinas y loci de factores de transcripción. Se aplicó dicho procedimiento en linfocitos CD4(+) obtenidos de pacientes con artritis reumatoide y esclerosis múltiple y se demostró que los linfocitos T CD4(+) infiltrantes del líquido sinovial están comprometidos tanto con el fenotipo de linfocitos Th1 como con el de los linfocitos T reguladores, mientras que la respuesta de linfocitos Th2 se suprime. Además, se demostró que el gen IL-17A está regulado por la metilación del promotor y que el compromiso de linfocitos Th17 no es una característica común en las articulaciones inflamadas de los pacientes con artritis reumatoide. Se concluyó que el procedimiento descrito en la publicación, por lo tanto, permitiría un perfilado preciso del compromiso del linaje Th en linfocitos T CD4 (+) aislados ex vivo.

15 La importancia de la metilación se hace particularmente evidente en las células tumorales. En este caso, los patrones de metilación "normales", que son esenciales para el desarrollo saludable de una célula, se pierden y, por lo tanto, las células ya no pueden ser controladas, y se vuelven no solo epigenéticamente aberrantes. Aunque la metilación aberrante no es el tema principal de la presente invención, el significado aparente de una correcta regulación epigenética se hace evidente por la estrecha asociación entre las células cancerosas y la metilación incorrecta. De esta forma, se puede concluir sobre la importancia de una metilación correcta. Para genes individuales, como se mostró anteriormente con el locus FOXP3 (Baron y col, Eur J Immunol. 2007 Sep;37(9):2378-89; Wieczorek y col. Cancer Res. 2009 Jan 15;69(2):599-608) y CD3 (Sehoully y col. Epigenetics. 2011 Feb 1; 6(2):236-46), la naturaleza química/estructural del ADN en los loci dados (tales como el estado de metilación/impronta) coincide con la diferenciación y el tipo de ciertas células. Esto permite una identificación y cuantificación del tipo celular de células sanas en función de su huella dactilar epigenética. El tema de debate actual es si la naturaleza altamente inflamatoria de los linfocitos Th17 es suficiente para causar o contribuir a la carcinogénesis (Wu S, Rhee KJ, Albesiano E y col. (Septiembre de 2009). "A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses". Nature Medicine 15 (9): 1016-1022; Huang C, Fu ZX. Localization of IL-17+Foxp3+ T cells in esophageal cancer. Immunol Invest. 2011;40(4):400-12. Epub 2011 Feb 11.).

20 Lexberg, Stability and plasticity of IL-17 expression in TH17 cells, Dissertation, Berlin 2010; <http://dx.doi.org/10.14279/depositonnce-2575> desvela un ensayo basado en metilación para linfocitos T IL-17+ generados *in vivo*, es decir, linfocitos que expresan IL-17 (página 56-58). Se utiliza FACS para aislar estas células (página 37). En consecuencia, las células se analizan en función de la expresión de IL-17 frente a la metilación. Se examinan dos regiones, una es el promotor de IL-17 (Figura 24) y la otra es la región de 5 kb cadena arriba de IL17 (Figura 23) que está involucrada con otro factor importante para la transcripción de IL17, RORyt (Figura 21). Sin embargo, en algunos linfocitos T IL17+ (il-17 + IFNy +), se encontró algo de metilación, en particular en la región de 5 kb cadena arriba de IL17, y el gen rorc estaba altamente metilado en linfocitos IL+, aunque RORyt se expresó en gran medida (Figura 25). Por lo tanto, se encontraron sorprendentes diferencias entre expresión y metilación.

25 En vista de lo anterior, a pesar de algunos avances en la técnica, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento mejorado basado en la accesibilidad a la conversión con bisulfito y/o el análisis de metilación del ADN como una herramienta superior para identificar y cuantificar de manera más conveniente y confiable los linfocitos T IL17 positivos en una muestra dada derivada/obtenida de, por ejemplo, sangre o tejido animal/humano. La medición se puede realizar ventajosamente independientemente de la purificación, el almacenamiento y, en cierta medida, también de la calidad del tejido.

30 En una vista adicional de lo anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento mejorado para identificar no solo células productoras de proteína IL-17 reales sino también células que son capaces de producir proteína IL-17 después de la estimulación mediante, p. ej. Ionomicina y PMA (forbol misristato acetato). En la actualidad, las técnicas comunes de identificación celular solamente detectan células que actualmente producen la proteína IL-17 (hasta el 0,1% de las células dentro de la sangre completa). Sin embargo, la proporción de células identificadas por la presente invención asciende a 0,1 - 2% abarcando células que son capaces de producir IL-17 (actualmente no producen IL-17), también. Las células IL17 positivas son células tales como los linfocitos Th17.

- 5 En un primer aspecto de la misma, la invención resuelve el problema anterior proporcionando un para identificar y cuantificar linfocitos T CD4 positivos IL-17 positivos en una muestra de sangre y/o tejido obtenida de un mamífero, que comprende a) analizar el estado de metilación de al menos una posición CpG en el gen IL-17A, en el que dicho análisis comprende una amplificación con un par de cebadores seleccionados de las SEQ ID NO: 18 y 19 como primer cebador; y las SEQ ID NO: 20 y 21 como segundo cebador, en el que una desmetilación de al menos una posición de dicha CpG en dicha muestra cuando se compara con una posición análoga en una célula sanguínea no IL-17 es indicativo de un linfocito T CD4 positivo IL-17 positivo, y b) cuantificar la cantidad de linfocitos T CD4 positivos IL-17 positivos basándose en dicho análisis en la etapa a).
- 10 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 cualquier otra muestra biológica que contenga potencialmente linfocitos T. Más preferentemente, dicha muestra es una muestra para la transferencia de células autólogas a un paciente, es decir, es una muestra a trasplantar a un paciente.
- 15 Una realización adicional de la invención comprende entonces el procedimiento de la invención, en el que dicho procedimiento comprende además la cuantificación de linfocitos Th17 en tejidos complejos en comparación con linfocitos Treg naturales, linfocitos T en general y/o en el tejido respectivo, en particular sangre o tejido enfermo sólido, o tejido adyacente independientemente de su origen. En otro aspecto, IL17A puede ser parte de un "Panel" de genes/marcadores, tales como, por ejemplo, CD3, FOXP3 y/o GAPDH, según lo medido en el caso de varios tipos celulares que son importantes para el estado inmunitario del mamífero.
- 20 Para una CpG particular según lo analizado, teóricamente hay cuatro estados por célula: (ambos alelos metilados), (alelo A metilado, alelo B no metilado), (alelo A no metilado, alelo B metilado) y (ambos alelos no metilados). Esto lleva a tres resultados diferentes: 100 % metilado, 50 % metilado y 0 % metilado. Por lo tanto, teóricamente, los linfocitos T IL-17 positivos están metilados al 0%, y los linfocitos T IL-17 no positivos están aproximadamente metilados al 100%. Una situación similar se presenta para el ensayo que analiza la accesibilidad de la región analizada a la conversión con bisulfito, donde los linfocitos T IL-17 positivos son accesibles al 0%, y linfocitos T IL-17 no positivos son accesibles aproximadamente al 100%.
- 25 En medidas prácticas empleando, por ejemplo, la secuenciación por bisulfito, rara vez se detectan los patrones de metilación "puros" completos, ya que tanto los ligeros déficits técnicos de las tecnologías empleadas como las posibles variaciones biológicas menores difuminan los valores teóricamente esperados. Por lo tanto, se prefieren los procedimientos de la invención, en los que al menos dicha posición CpG en dicha región analizada está desmetilada en más del 80%, preferiblemente más del 90%, y lo más preferido más del 95%, cuando se compara con una posición análoga en un linfocito T IL-17 no positivo.
- 30 Además, la presente invención incluye procedimientos, en los que se analiza más de una posición CpG en una región, tales como, por ejemplo, las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. A continuación, se puede determinar una metilación global (o desmetilación) de la región analizada, cuando se compara con una región análoga en un linfocito T IL-17 no positivo. Por lo tanto, también se prefieren los procedimientos de la invención, en los que dicha región está desmetilada (hipometilada) en más del 70%, preferiblemente más del 80%, o 90%, y la más preferida es más del 95% cuando se compara con una región análoga (hiper o totalmente metilada) en un linfocito T IL-17 no positivo.
- 35 El experto también podrá seleccionar subconjuntos específicos de posiciones CpG con el fin de minimizar la cantidad de sitios a analizar.
- 40 Otro aspecto más se refiere a un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que el análisis del estado de metilación comprende un procedimiento seleccionado a partir de digestiones enzimáticas específicas de metilación, secuenciación por bisulfito, análisis seleccionado de metilación del promotor, metilación de isla CpG, MSP, HeavyMethyl, MethyLight, Ms-SNuPE, qPCR u otros procedimientos que dependen de una detección de ADN genómico, ADN modificado química o enzimáticamente o ADN genómico amplificado o modificado química o enzimáticamente. También se prefiere un análisis adicional del marcador CD4, CD3, FOXP3 y/o GAPDH.
- 45 Otra realización de la invención se refiere a los procedimientos anteriores, en los que dicha identificación comprende una cuantificación de dichos linfocitos T IL17 positivos, y a continuación comprende además la etapa de decidir el estado inmunitario de dicho mamífero basándose en dichos linfocitos T que expresan IL-17 identificados. De este modo, en una muestra de un mamífero, que incluye sangre completa o varias subfracciones, así como tejidos o subfracciones aisladas de tejidos, los linfocitos T IL-17 positivos pueden identificarse y cuantificarse debido a su patrón de metilación (único) en los genes analizados. Basándose en esto, también pueden cuantificarse, ya que la pérdida de metilación se correlaciona estrictamente con los linfocitos T IL-17 positivos. La cuantificación comprende una cuantificación de los linfocitos IL-17 en dicha muestra basada en una comparación de la metilación de IL-17 con una metilación de al menos un marcador seleccionado del grupo de CD3, FOXP3 y/o GAPDH.
- 50 En el presente documento, el "estado inmunitario" de una persona significará el estado del sistema inmunitario de una persona dada en una situación dada, en cualquier tipo de tejido dado en cualquier situación de enfermedad dada. Por ejemplo, puede ser importante determinar el estado inmunitario en una biopsia de tejido (tumor) de una persona que padece un tumor sólido. Asimismo, puede ser relevante determinar el estado inmunitario de una
- 55

5 persona (presumiblemente) sana en la sangre periférica para determinar el estado de salud de las personas, por lo que tanto un aumento como una disminución de las células, según lo cuantificado por el número dado de copias metiladas y no metiladas de los genes analizados, en particular IL-17, pueden ser indicativos de una enfermedad, tal como, por ejemplo, de la presencia de un tumor en un sitio desconocido del cuerpo, o de una reacción autoinmunitaria o de una infección crónica.

10 En particular, los inventores consideran que los procedimientos descritos en el presente documento son adecuados para la aplicación de rutina, por ejemplo en un chip de ADN. Las muestras se seleccionan de una muestra fresca, congelada en fresco o totalmente preparada (tal como por ejemplo, incrustada en parafina y fijada con formalina), que incluyen líquido corporal de mamíferos, muestras de sangre humana preferente, (muestras de suero) o muestras de tejido sólido tumoral o no tumoral, muestra de sangre de órganos o tipos celulares. Estas muestras deben ser de mamíferos, preferentemente ratón, rata, mono, bovino, porcino o ser humano. Especialmente preferido es un mamífero, el más preferido es un ser humano, que padece o es probable que padezca enfermedades mediadas por IL-17 y efectos secundarios de terapias anti-IL-17, tales como, por ejemplo, enfermedades psoriásicas, psoriasis, artritis psoriásica, enfermedades reumáticas como, por ej. artritis reumatoide, esclerosis múltiple, arteriosclerosis, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedades inflamatorias, uveítis, enfermedades de hepatitis, lupus, enfermedades pulmonares (p.ej. asma), síndrome hiper IgE, inmunidad antitumoral, lesiones renales, shock endotóxico por infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas, parasitarias) y enfermedades autoinmunitarias, infecciones víricas o bacterianas, rechazos de trasplantes, cáncer, incluidos los cánceres sólidos y no sólidos, y/o la alergia o cualquier enfermedad directamente relacionada con los linfocitos T que expresan IL-17. La presente invención también puede usarse para controlar terapias anti-IL-17 en un paciente y/o grupo de pacientes.

25 El documento WO2012 / 093254A1 describe el uso de lipocalina 2 (LCN2) como biomarcador para enfermedades mediadas por IL-17 y para controlar la respuesta de un paciente a terapia anti-IL-17 y enfermedades relacionadas con IL-17 que también son relevantes para el presente invención, tal como un trastorno seleccionado del grupo que consiste en artritis, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil de inicio sistémico(HA), lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis múltiple, asma, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, dermatitis atópica, esclerodermia, esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y espondilitis anquilosante y otras espondiloartropatías.

30 Otro aspecto más se refiere a un procedimiento de acuerdo con la presente invención, que comprende además la etapa de decidir sobre el número y/o la cantidad de dichos linfocitos T IL-17 positivos identificados en dicha muestra basándose en dicha identificación y cuantificación.

En otras alternativas, se pueden aplicar experimentos de control adicionales (por ejemplo, análisis de GAPDH desmetilado en paralelo) (véase también anteriormente).

35 En un aspecto adicional, el procedimiento de la invención es útil para controlar el nivel de linfocitos T IL-17 positivos en un mamífero, que comprende un procedimiento de acuerdo con la invención y que compara la cantidad de linfocitos T IL-17 positivos identificados con una muestra anterior tomada del mismo mamífero, y o con una muestra de control.

40 Otro aspecto más se refiere a un procedimiento de acuerdo con la presente invención, que comprende además la etapa de decidir sobre el estado inmunitario de dicho mamífero basándose en el número y/o cantidad de dichos linfocitos T que expresan IL17 identificados en dicha muestra como se describe en el presente documento anteriormente.

45 Otro aspecto más se refiere a un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que dicho mamífero padece o es probable que padezca enfermedades mediadas por IL-17 y efectos secundarios de terapias anti-IL-17, tales como, por ejemplo, enfermedades psoriásicas, psoriasis, artritis psoriásica, enfermedades reumáticas como, por ej. artritis reumatoide, esclerosis múltiple, arteriosclerosis, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedades inflamatorias, uveítis, enfermedades de hepatitis, lupus, enfermedades pulmonares (p.ej. asma), síndrome hiper IgE, inmunidad antitumoral, lesiones renales, infecciones por shock endotóxico (víricas, bacterianas, fúngicas, parásitarias) y enfermedades autoinmunitarias, infecciones víricas o bacterianas, rechazos de trasplantes, cáncer, incluidos los cánceres sólidos y no sólidos, y/o la alergia o cualquier enfermedad directamente relacionada con los linfocitos T que expresan IL-17.

En otro aspecto de la presente invención, el procedimiento también es útil para medir y/o controlar la cantidad de dichos linfocitos T que expresan IL-17 en respuesta a sustancias químicas y/o biológicas proporcionadas a dicho mamífero.

55 Se revela un amplicón según la SEQ ID NO: 1 o una región diana del mismo, preferentemente de acuerdo con las SEQ ID NO. 2 o 3. El amplicón se puede utilizar como una herramienta en los procedimientos desvelados.

La invención también proporciona el uso de un kit para identificar, cuantificar y/o controlar linfocitos T CD4 positivos IL-17 positivos en una muestra de sangre y/o tejido obtenida de un mamífero, que comprende materiales para realizar un procedimiento de acuerdo con la invención como se describe anteriormente en este documento.

La presente invención resuelve el problema anterior de que la detección de linfocitos T que expresan IL-17 y su distinción entre sí, es problemática en prácticamente todas las aplicaciones en I+D y en particular en todas las aplicaciones clínicas (de rutina) al proporcionar un procedimiento para identificar linfocitos T que expresan IL-17 de un mamífero, que comprenden analizar el estado de metilación de al menos una posición CpG en una o varias, por ejemplo, regiones reguladas, potencialmente diferencialmente metiladas del gen para IL-17, en las que una desmetilación y/o accesibilidad a la conversión con bisulfito es altamente específica o indicativa para linfocitos T que expresan IL-17.

En otra realización preferida de la presente invención, además, los inventores presentan una forma novedosa y más específica para controlar los linfocitos T que expresan IL-17 en todos los fluidos corporales humanos, incluidas muestras de sangre completa humana, o en cualquier tejido (sólido), órgano o tipo celular dado.

El concepto de la invención se basa generalmente en una desmetilación específica y/o accesibilidad al bisulfito y otra conversión química específica de base de ADN de la región genética IL-17 en linfocitos T que expresan IL-17. Usando un procedimiento de PCR cuantitativa simple y preciso, como un procedimiento de amplificación de señal (por ejemplo, un procedimiento de PCR cuantitativa preciso u otro procedimiento que permita la determinación de copias de las moléculas de ácido nucleico), los inventores muestran que la desmetilación de la región IL-17A y o la accesibilidad a la conversión con bisulfito representa marcadores sustitutos para los recuentos de linfocitos T que expresan IL-17 en sangre o tejidos. Los presentes inventores han identificado así regiones particulares y nuevas dentro del gen IL-17 que están implicadas funcionalmente, o están asociadas de forma fiable con, la existencia de linfocitos T que expresan IL-17.

El aspecto principal de la presente invención es la distinción entre y en medio de las fracciones funcionalmente diferentes de los linfocitos T, a saber, la fracción de linfocitos T que expresa IL-17 por un lado y los otros tipos de células humanas/animales por otro lado.

Los inventores podrían demostrar que en todos los linfocitos T que expresan IL-17 los motivos CpG están casi completamente desmetilados (es decir, más del 70 %, preferentemente el 80 %, preferentemente, más del 90 % y lo más preferente más del 95 %, véase anteriormente), mientras que los mismos motivos están completamente metilados en todos los linfocitos T que expresan IL-17. La determinación del estado de metilación de los loci IL-17 es, por lo tanto, una herramienta valiosa para identificar los linfocitos T que expresan IL-17, tal como se requerirá/o al menos algún valor para medir las linfocitos T que expresan IL-17 en enfermedades autoinmunitarias, infecciones (víricas), rechazos de trasplantes, cáncer, infecciones y/o alergia. El ensayo permite la medición de linfocitos T que expresan IL-17 en muestras biológicas "complejas" (es decir, muestras, tales como tejido y/o sangre) que contienen más de un tipo de célula, preferentemente más de un tipo de célula sanguínea) sin purificación ni procedimientos de tinción. Como realización particularmente preferida, la medición de linfocitos T que expresan IL-17 por cualquiera de los marcadores descritos aquí se puede detectar y cuantificar fácilmente desde muestras de tejido sólido de naturaleza sana o enferma. Incluidos tejidos tumorales o no tumorales. Para tal análisis es posible realizar el análisis ya sea a partir de tejido fresco, congelado en fresco o de cualquier tipo conservado tal como por ejemplo, incrustada en parafina y fijada con formalina). Otra realización preferida es determinar la proporción entre linfocitos T que expresan IL-17 por un lado y otros tipos de linfocitos T por el otro.

Los inventores han demostrado que el potencial para formar propiedades de linfocitos T que expresan IL-17 de células inmunitarias de mamíferos coincide con la epigenética, es decir, la regulación basada en la metilación del ADN en la región genética de IL-17. La metilación del ADN es una modificación epigenética biológica y químicamente estable, que da como resultado cambios en la expresión génica a largo plazo. Los inventores encontraron que la desmetilación y/o la accesibilidad del ADN genómico a la conversión con bisulfito en el locus IL-17 humano se restringe a los linfocitos T que expresan IL-17 cuando se probó contra todos los principales tipos de células de sangre periférica y una selección de diferentes tipos/líneas celulares no sanguíneas. Estos datos indicaron que las modificaciones epigenéticas en el locus IL-17A sirven como un marcador valioso para la identificación de células con el fenotipo de linfocitos T que expresan IL-17, independientemente de la expresión de cualquier gen.

Está bien establecido en la técnica que a menudo los elementos reguladores de genes adicionales e importantes que están sujetos a regulación génica por metilación se ubican cadena arriba y cadena abajo de un marco de lectura abierto de un gen dado, p. ej., regiones potenciadoras, que son sitios de unión para reguladores transcripcionales indispensables. Por lo tanto, se desvela un análisis de estos elementos, que pueden ubicarse dentro de 10000 bases cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción de IL-17A, preferentemente 9000 bases, 8000 bases, 7000 bases, 6000 bases, 5000 bases, 4000 bases, 3000 bases o 2000 bases cadena arriba de IL-17A, incluso más preferida es una región 1000 bases cadena arriba del inicio transcripcional de IL-17A y más preferentemente en las primeras 500 bases cadena arriba del sitio de inicio transcripcional de IL-17A.

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 describen a continuación, por ejemplo en el contexto de MSP, HeavyMethyl, Scorpion, MS-SNUPE, MethylLight, secuenciación o ensayos de restricción específicos de metilo. Con la amplificación, se produce el amplicón del gen IL-17A como se describe en el presente documento que es una "herramienta" particularmente preferida para realizar el(los) procedimiento(s) de acuerdo con

la presente invención. En consecuencia, se desvela un par de cebadores para la amplificación de las regiones de acuerdo con la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 20.

Además, se prefiere un procedimiento de acuerdo con la invención, en el que se utilizan (pueden usarse) más de 5 mM de MgCl₂ en la reacción de amplificación, preferentemente hasta 6,4 mM de MgCl₂.

- 5 Además, se prefiere un procedimiento de acuerdo con la invención, que comprende adicionalmente la etapa de analizar los marcadores celulares CD3, CD4, FOXP3 y/o GAPDH. Para analizar estos marcadores adicionales, se puede usar cualquier procedimiento conocido para analizar la expresión, como los procedimientos que usan anticuerpos y/o análisis de metilación. El análisis de estos marcadores preferentemente mejora adicionalmente la precisión del análisis y podría permitir identificar subconjuntos de células. Por lo tanto, el procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende una identificación que es una distinción de dichos linfocitos T que expresan IL-17 de todos los tipos principales de células sanguíneas periféricas o células no sanguíneas.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención se puede realizar con cualquier mamífero que tenga los marcadores anteriores, se prefiere un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que dicho mamífero es un ratón, rata, cerdo o vaca, mono o ser humano, preferentemente un ser humano.

- 15 El (los) procedimiento(s) de acuerdo con la presente invención se realiza(n) *in vitro*. En general, se pueden usar todas las muestras biológicas, siempre que contengan células adecuadas o ADN adecuado de células de interés. Se prefiere un procedimiento en el que dicha muestra se selecciona de una muestra fresca, congelada en fresco o totalmente preparada que incluye fluido corporal de mamífero, muestras de sangre completa humana preferente, muestras de suero o una muestra de sangre de tejido sólido, órgano o tipo celular sanguíneo tumoral o no tumoral, una muestra de linfocitos sanguíneos o una fracción de los mismos.

- Otro aspecto preferido de la presente invención se refiere, por lo tanto, al uso del procedimiento de acuerdo con la presente invención como se indica anteriormente en diagnósticos y el uso en el control de enfermedades. Por lo tanto, en una realización alternativa, la invención se dirige a un procedimiento según la presente invención que comprende además la etapa de decidir sobre el estado inmunitario de dicho mamífero basándose en dichos linfocitos T que expresan IL-17 identificados y/o cuantificados. En dicho procedimiento de acuerdo con la invención, una desmetilación de al menos una posición CpG en el gen IL-17A es indicativa de un linfocito T que expresa IL-17.

- Otro aspecto importante de la presente invención se refiere, por lo tanto, a un procedimiento de acuerdo con la presente invención para controlar el nivel de linfocitos T que expresan IL-17 en un mamífero, que comprende un procedimiento de acuerdo con la invención como el anterior y que compara la cantidad de linfocitos T que expresan IL-17 identificados con una muestra anterior tomada del mismo mamífero, y o con una muestra de control. Preferentemente, dicho procedimiento se realiza en una muestra de un mamífero que padece o es probable que padezca enfermedades autoinmunitarias mediadas por IL-17 y efectos secundarios de terapias anti-IL-17, tales como, por ejemplo, enfermedades psoriásicas, psoriasis, artritis psoriásica, enfermedades reumáticas como, por ej. artritis reumatoide, esclerosis múltiple, arteriosclerosis, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedades inflamatorias, uveítis, enfermedades de hepatitis, lupus, enfermedades pulmonares (p.ej. asma), síndrome hiper IgE, inmunidad antitumoral, lesiones renales, shock endotóxico por infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas, parasitarias) y enfermedades autoinmunitarias, infecciones víricas o bacterianas, rechazos de trasplantes, cáncer, incluidos los cánceres sólidos y no sólidos, y/o la alergia o cualquier enfermedad directamente relacionada con los linfocitos T que expresan IL-17.

- Más preferido, dicho procedimiento según la invención comprende además medir y/o controlar la cantidad de linfocitos T que expresan IL-17 en respuesta a sustancias químicas y/o biológicas que se proporcionaron a dicho mamífero. Es decir, se pueden seguir los cambios en la cantidad o proporción de linfocitos T que expresan IL-17 causados por, por ejemplo, el tratamiento de una enfermedad (por ejemplo, como se describe en el presente documento), y el éxito y/o progreso de dicho tratamiento en términos de un efecto sobre los linfocitos T que expresan IL-17 usando este procedimiento. Un seguimiento del patrón de metilación basado en los marcadores del presente documento indicará cambios en las células que se deben a una respuesta a dichas sustancias químicas y/o biológicas, en algunos casos incluso antes de que se pueda observar un cambio fenotípico.

- Se desvela un procedimiento para identificar sustancias químicas y/o biológicas que modulan selectivamente los linfocitos T que expresan IL-17 que expresan los marcadores como se describe en el presente documento, que comprenden poner en contacto una o más de dichas sustancias químicas y/o biológicas con linfocitos T que expresan potencialmente IL-17 y detectar, si dicha sustancia química y/o biológica modula la metilación de las posiciones CpG analizadas, y o si una o más de dicha sustancia química y/o biológica modula selectivamente la cantidad y/o la proporción de linfocitos T que expresan IL-17 que expresan marcadores. Particularmente preferida es una modulación de dichos linfocitos T que expresan IL-17 que aumenta la cantidad y/o proporción de dichos linfocitos T que expresan IL-17.

El procedimiento se puede realizar *in vitro* y/o en un animal adecuado. En este aspecto, se desvela un procedimiento, a veces llamado "procedimiento de análisis", que busca identificar sustancias químicas y/o biológicas que modulan la expresión de los marcadores anteriores y que se pueden usar como puntos de partida para el

desarrollo de medicación específica de linfocitos T que expresan IL-17 y composiciones farmacéuticas respectivas. El presente procedimiento se basa en el hecho de que está bien aceptado que los genes marcadores identificados en el presente documento deben desempeñar un papel central para el desarrollo de linfocitos T que expresan IL-17. Por lo tanto, los factores que estimulan la expresión de los marcadores son interesantes para el tratamiento de los

5 pacientes. Tales factores, que conducen a una modificación estable, preferentemente la inducción, del desarrollo/proporción/cantidad de linfocitos T que expresan IL-17, pueden detectarse con el procedimiento descrito en esta invención.

10 Las sustancias químicas y/o biológicas que son adecuadas como compuestos de análisis son conocidas por la persona experta y, por ejemplo, incluyen moléculas pequeñas, péptidos y proteínas, y anticuerpos o fragmentos de los mismos. Además, el análisis se puede realizar utilizando una biblioteca de compuestos comerciales, de manera óptima junto con una automatización adecuada, como un robot. En una realización preferida del procedimiento para identificar sustancias químicas y/o biológicas, dicha sustancia proporciona una desmetilación de las posiciones CpG analizadas al menos del 80%, preferentemente del 90%, y más preferentemente del 95%.

15 Se desvela un procedimiento, que comprende además la etapa de proporcionar un tratamiento para un paciente que padece o es probable que padezca enfermedades mediadas por IL-17 y efectos secundarios de terapias anti-IL-17, tales como, por ejemplo, enfermedades psoriásicas, psoriasis, artritis psoriásica, enfermedades reumáticas como, por ej. artritis reumatoide, esclerosis múltiple, arteriosclerosis, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedades inflamatorias, uveítis, enfermedades de hepatitis, lupus, enfermedades pulmonares (p.ej. asma), síndrome hiper IgE, inmunidad antitumoral, lesiones renales, shock

20 endotóxico por infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas, parasitarias) y enfermedades autoinmunitarias, infecciones víricas o bacterianas, rechazos de trasplantes, cáncer, incluidos los cánceres sólidos y no sólidos, y/o la alergia o cualquier enfermedad directamente relacionada con linfocitos T que expresan IL-17, en el que dicho tratamiento modula, y preferentemente aumenta la cantidad y/o proporción de linfocitos T que expresan IL-17 en dicho paciente, preferentemente, autoinmune o de cáncer. Se prefiere un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que dicho tratamiento se selecciona entre proporcionar sustancias químicas y/o biológicas que estimulan selectivamente los linfocitos T que expresan IL-17 en dicho paciente, o un tratamiento que estimula la expresión de los genes marcadores anteriores o apoya la actividad biológica de dichos genes marcadores en dichos linfocitos T que expresan IL-17 en dicho paciente. Los ejemplos preferidos de tales tratamientos son agentes de desmetilación que proporcionan una metilación reducida de dichos genes. Otros ejemplos preferidos de tales

25 tratamientos son agentes que proporcionan un número reducido de linfocitos T que expresan IL-17 en caso de enfermedades autoinmunitarias.

Otro aspecto preferido más de la presente invención se refiere a un procedimiento mejorado de tratamiento de enfermedades que están relacionadas con la expresión de genes marcadores y/o la desmetilación, enfermedades mediadas por IL-17 y efectos secundarios de terapias anti-IL-17, tales como, por ejemplo, enfermedades psoriásicas, psoriasis, artritis psoriásica, enfermedades reumáticas como, por ej. artritis reumatoide, esclerosis múltiple, arteriosclerosis, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedades

35 inflamatorias, uveítis, enfermedades de hepatitis, lupus, enfermedades pulmonares (p.ej. asma), síndrome hiper IgE, inmunidad antitumoral, lesiones renales, shock endotóxico por infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas, parasitarias) y enfermedades autoinmunitarias, infecciones víricas o bacterianas, rechazos de trasplantes, cáncer, incluidos los cánceres sólidos y no sólidos, y/o la alergia o cualquier enfermedad directamente relacionada con linfocitos T que expresan IL-17, que comprende un procedimiento como se describe en el presente documento anteriormente. El término "tratamiento" también incluye una prevención de la expresión de genes marcadores y/o enfermedades relacionadas con la desmetilación.

40 En otro aspecto más de la presente invención, la presente invención se refiere al uso de un kit de acuerdo con la presente invención para identificar, cuantificar y/o controlar linfocitos T que expresan IL-17 en un mamífero.

La presente invención se describirá ahora con más detalle en forma de realizaciones preferidas de la misma en los siguientes ejemplos, sin embargo, sin limitarse a los mismos.

La Figura 1 muestra los resultados del molde de prueba amplificado de acuerdo con el Ejemplo 1. Molde TpG: ADN de prueba no metilado; Molde CpG: ADN de prueba metilado; NTC: Control sin molde.

50 La Figura 2 muestra A) la secuencia genómica del amplicón No. 1909 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. La región diana del ensayo de qPCR está subrayada, las posiciones CpG de interés tienen doble subrayado; B) la región diana 1 convertida con bisulfito del sistema de ensayo de qPCR (específico de TpG), el cebador y la sonda están subrayados, las posiciones CpG de interés tienen doble subrayado; y C) la región diana 2 alternativa convertida con bisulfito del sistema de ensayo de qPCR (específico de TpG), el cebador y la sonda están subrayados, la región diana se indica en negrita; las posiciones de interés CpG tienen doble subrayado.

55 La Figura 3 demuestra la especificidad del sistema de ensayo de qPCR de IL17A ILP específico de TpG preferido según el Ejemplo 3 para el ADN molde desmetilado. Se muestran los perfiles de amplificación de diluciones en serie de patrones de plásmidos que llevan la región diana del gen IL17A (convertidos con bisulfito, no metilados). Además, se muestran los perfiles de amplificación de los moldes de plásmidos sin metilar (TpG;

curva gris) y metilados (CpG; curva gris oscuro) (86000 copias cada uno). El sistema de qPCR de IL17A específico de TpG amplifica solo el ADN molde no metilado con alta especificidad, pero no el molde metilado, y muestra que no hay reactividad cruzada desde el punto de vista técnico en el ensayo.

5 La Figura 4 demuestra el análisis de una muestra compleja (por ejemplo, muestra de sangre) (sangre periférica) para la detección de la cantidad relativa de linfocitos T IL17 positivos. La figura superior ilustra el sistema de qPCR de IL17A específico de TpG -dimetilo-). Se muestran los perfiles de amplificación de los patrones de plásmidos (50000-80 copias). Una curva patrón (lineal) derivó de los perfiles al representar el valor de CP medido sobre el logaritmo de la concentración del molde. Los perfiles de amplificación de la muestra de sangre se representan en gris claro y se etiquetan con la flecha. Curva gris oscuro: control "sin molde" (NTC). La figura superior ilustra el sistema de qPCR de GAPDH específico de TpG -dimetilo-). Se muestran los perfiles de amplificación de los patrones de plásmidos (50000-16 copias). Una curva patrón (lineal) derivó de los perfiles al representar el valor de CP medido sobre el logaritmo de la concentración del molde. Los perfiles de amplificación de la muestra de sangre se representan en gris claro y se etiquetan con la (gris claro) flecha. Curva gris oscuro: control "sin molde" (NTC).

15 La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de nucleótidos de AMP 1909;

La SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3 muestran la secuencia de nucleótidos de las regiones diana de acuerdo con la figura 2;

Las SEQ ID NO: 4 a 16 muestran las secuencias de nucleótidos de los cebadores y las sondas usados en los ejemplos.

20 La SEQ ID NO: 17 desvela el ARNm para IL17(A) humana.

Las SEQ ID NO: 18 a 22 muestran las secuencias de nucleótidos de los cebadores y sondas particularmente preferidos usados en el ejemplo 3.

Ejemplos

Ejemplo 1

25 Los inventores han purificado varios subconjuntos de sangre, incluidos linfocitos T. El ADN de las células purificadas se trató con bisulfito y se analizó en varios motivos de dinucleótidos CpG. A continuación, los inventores compararon el estado de metilación (denominando C a la citosina que estaba metilada en la secuencia original (genómica) frente a T para la citosina que no estaba metilada en la secuencia original).

30 Sorprendentemente, se encontró que las áreas específicas en la región genómica de IL-17 estaban significativamente desmetiladas en linfocitos T IL-17 positivos en comparación con cualquier otro tipo celular.

A continuación, al encontrar la metilación diferencial, los inventores analizaron regiones genómicas más grandes por medio de la secuenciación con bisulfito. Este último procedimiento sirvió para explorar y extender la región metilada diferencialmente y se realizó, por ejemplo, con la región génica metilada diferencialmente de IL-17A como se desvela en este documento.

35 La asociación estricta de los linfocitos T IL-17 positivos con la desmetilación en el gen y en particular las regiones analizadas (amplicones) también podría demostrarse sorprendentemente fuera de las sub-fracciones de los linfocitos CD4 positivos, y se encontró que es fuerte también en muestras biológicas complejas como muestras de sangre completa o muestras de tejido (incluso no tripsinizadas).

Ejemplo 2

40 Desarrollo de ensayos específicos de qPCR.

A partir de los resultados obtenidos en el Ejemplo 1, se identificó una región genómica de interés que incluye las posiciones CpG preferentes para analizar (amplicón 1909, véase la Figura 2).

En esta región, se realizó un análisis detallado para desarrollar un ensayo de qPCR altamente específico basado en los siguientes cebadores y sonda de amplificación (véase la Figura 2B):

45 Cebador directo: qPCR14 nmF2.2: TCTTCTATAACCTCATTAAAAACAA (SEQ ID NO: 4);
Cebador inverso: qPCR14 nmR2.1: GAGATGGATAAAATGTAGTGTATT (SEQ ID NO: 5);
Sonde de Hidrólisis: qPCR14 nmP2.3: ACCCACTACAACACACCACATAAAT (SEQ ID NO: 6).

La especificidad del sistema de PCR específico de TpG se probó basándose en moldes de prueba (véase la Figura 1) y se encontró que era sumamente fuerte y específica para linfocitos T IL17 positivos.

50 Además, para un ensayo alternativo en la región diana anterior (región 1) del sistema de ensayo de qPCR

(alternativas) se desarrollaron variantes de cebadores de la siguiente manera:

qPCR14 nmF2.1: TTCTTCTATAACCTCATTAAAAACA (SEQ ID NO: 7). y
qPCR14 nmR2.2: ATGGATAAAATGTAGTGTTATTGT (SEQ ID NO: 8).

5 Además de la región diana (región 1), se analizó una región alternativa adicional (región 2) para un ensayo de qPCR dentro del amplicón No. 1909 utilizando los cebadores y las sondas de la siguiente manera (véase la Figura 2c):

Cebadores de amplificación:

10 qPCR14 nmF2.3: AACCCACTACAACACACCACA (SEQ ID NO: 9);
qPCR14 nmF2.4: ACCCACTACAACACACCACATA (SEQ ID NO: 10);
qPCR14 nmR2.3: AATGAGGTTTTTTTAGGAGTTATT (SEQ ID NO: 11);
qPCR14 nmR2.4: TGAGGTTTTTTTAGGAGTTATTG (SEQ ID NO: 12);
qPCR14 nmR2.5: TGGTTTAAATTAGTAAGAGTATTGTAT (SEQ ID NO: 13);
qPCR14 nmR2.6: GTTTAAATTAGTAAGAGTATTGTATGT (SEQ ID NO: 14);

Las sondas de hidrolización para esta región serían:

15 qPCR14 nmP2.5: AAAAAACAATAACACTACATTTTATCCATCTCA (SEQ ID NO: 15); y
qPCR14 nmP2.6: TGAGATGGATAAAATGTAGTGTTATTGTTTTTT (SEQ ID NO: 16).

Ejemplo 3

Desarrollo de ensayos optimizados de qPCR específica de IL17A.

20 Con el fin de desarrollar sistemas de cebadores "perfectos" particularmente preferidos para el ensayo, se desarrollaron cebadores que no corresponden al 100% de la secuencia tratada con bisulfito original, pero incluyen desajustes específicos que aumentan sorprendentemente la especificidad.

Ensayo de qPCR14(Th17)		Run - ID: 110930UB qPCR14 MDA-DII+WBL						Análisis de Datos		
Patrones para la cuantificación		Sistema de PCR específico para "TpG"			Sistema de PCR específico para "GAPDH"					
ID patrón	Unidades de Plásmidos	Valor de CP	Copias Plásmidos	C.V.(%)	Valor de CP	Copias Plásmidos	C.V.(%)	Th17 [%]	S.D.	C.V. (%)
Patrón-1	50.000 Copias	22,9	49833,33	1,0	23,4	50933,33	6,1			
Patrón-2	10.000 Copias	25,2	10200,00	0,98	25,7	10233,33	2,03			
Patrón-3	2.000 Copias	27,7	1943,33	1,8	28,0	2110,00	3,3			
Patrón-4	400 Copias	30,0	411,0	3,0	30,6	354,0	3,4			
Patrón-5	80 Copias	32,2	78,60	12,41	32,6	86,27	3,25			
Patrones	16 Copias	34,20	16,10	ND	35,19	16,00	6,19	50,16	6,24	6,19
NTC	Control sin molde	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
Muestras analizadas		Sistema de PCR específico para "TpG"			Sistema de PCR específico para "GAPDH"					
Epuntos-ID	Ciente-ID	Valor de CP	Copias de Plásmidos	C.V.(%)	Valor de CP	Copias de Plásmidos	C.V.(%)	Th17 [%]	S.D.	C.V. (%)
WBL63		34,17	16,70	16,86	26,07	7996,67	0,63	0,21	0,03	14,61

La Tabla 1 resume los resultados del análisis de qPCR de la muestra de sangre (WBL63). Se muestran los valores de CP para los patrones de plásmidos medidos en el LightCycler LC480 y los de la muestra de sangre (WBL63), cada uno para el sistema de PCR de IL17A y el sistema de PCR de GAPDH (control/normalización/estandarización). Basándose en el patrón de plásmidos, los números de copias correspondientes (copias de plásmidos) se calcularon a partir del valor de CP medido. En este caso, el valor de C.V. describe la extensión de la desviación de las mediciones por triplicado.

El porcentaje de linfocitos T IL17 positivos en la muestra se puede calcular a partir del número de copias de IL17A desmetiladas (= 16.7) y el número total de copias en la muestra (= 7996,67; medido por el sistema de PCR de GAPDH) de la siguiente manera:

$$\% \text{ linfocitos T IL17 positivos} = \text{copias de IL17A desmetiladas} / \text{copias totales} \times 100$$

$$\% \text{ linfocitos T IL17 positivos} = 16,7 / 7996,67 \times 100 = 0,21\%$$

El presente ensayo es especial en el sentido de que la amplificación del ADN diana de IL17A desmetilado (y convertido con bisulfito) utilizando cebadores ajustados "comunes" y protocolos de PCR patrón no proporciona un resultado suficiente. Solo después de usar cebadores de amplificación que tienen una mutación (una "falta de coincidencia") en sitios estratégicos como se identifica en el presente documento, junto con el uso de una concentración mucho mayor de MgCl₂ en la PCR, se logra una amplificación eficiente de la región diana de IL17A. Se identificaron de este modo cuatro pares de cebadores particularmente preferidos que permitieron una amplificación particularmente eficaz de la región diana de IL17A, a saber, PM-2,47nm, PM-2,48nm, PM-2,53nm y PM-2,54nm. Una combinación de cebadores (primermix PM-2,53nm) fue particularmente eficaz en la amplificación, y por lo tanto conduce a un rendimiento mejorado del ensayo de qPCR. Esta combinación de cebadores también se usó en los experimentos mostrados en las Figuras 3 y 4.

Las secuencias de los cebadores de amplificación y la "sonda Taqman" son las siguientes. Ensayo de qPCR: oligonucleótidos (5' → 3')

1. Cebadores de amplificación

- 25 Cebador Directo qPCR14 nmF2.1_M1: ATTCTTCTATAACCTCATTAAAAGCA (SEQ ID NO: 18);
- Cebador Directo qPCR14 nmF2.2_M1: TTCTTCTATAACCTCATTAAAAGCAA (SEQ ID NO: 19);
- Cebador Inverso qPCR14 nmR2.1: GAGATGGATAAAATGTAGTGTTATT (SEQ ID NO: 20);
- Cebador Inverso qPCR14 nmR2.2b: GATGGATAAAATGTAGTGTTATTG (SEQ ID NO: 21).

Los desajustes en la secuencia del cebador están subrayados y en negrita. Para una amplificación efectiva se utilizan las siguientes combinaciones de cebadores:

PM-2,47nm:	qPCR14 nmF2.1_M1+	qPCR14 nmR2.1
PM-2,48nm:	qPCR14 nmF2.1_M1+	qPCR14 nmR2.2b
PM-2,53nm *:	qPCR14 nmF2.2_M1+	qPCR14 nmR2.1
PM-2,54nm:	qPCR14 nmF2.2_M1+	qPCR14 nmR2.2b

* indica la mejor eficacia de amplificación en la prueba (realización particularmente preferida).

2. Sonda Taqman

qPCR14 nmP5: CCACTACAACACACCACATAAAT (SEQ ID NO: 22) Como condiciones de reacción modificadas (véase anteriormente), se podrían usar preferentemente hasta 6,4 mM de MgCl₂ en el ensayo, es decir, por encima de 5 mM de MgCl₂.

35 **Ejemplo 4**

Proporción de linfocitos IL17A positivos medidos por citometría de flujo y ensayo de conversión con bisulfito.

Los inventores analizaron la conversión con bisulfito en muestras de sangre periférica estimulada y no estimulada con PMA e ionomicina y observaron la desmetilación del gen IL17A. Los resultados se compararon con los análisis de citometría de flujo que detectaron linfocitos IL17A positivos (tabla 2).

40

	% de linfocitos desmetilados IL17A evaluados mediante conversión con bisulfito	Detección de células productoras de IL17A mediante citometría de flujo
No estimulada	1-2 %	< 0,1 %
	% de linfocitos desmetilados IL17A evaluados mediante conversión con bisulfito	Detección de células productoras de IL17A mediante citometría de flujo
Estimulada por ej. por PMA e ionomicina	1-2 %	1-2 %

La Tabla 2 resume los resultados de la citometría de flujo y el análisis de desmetilación de IL17A de sangre periférica estimulada y no estimulada.

5 Los resultados muestran aprox. 1-2% de desmetilación de IL17A en muestras de sangre periférica de donantes sanos que es virtualmente IL17A negativa cuando se analiza mediante citometría de flujo. Además, después de la estimulación de sangre periférica con PMA/ionomicina, los inventores todavía miden aprox. de 1-2% de desmetilación de IL17A pero los niveles de proteína IL17A saltan hasta valores de ca. 1-2%.

10 Sorprendentemente, el nuevo ensayo detecta la proporción de linfocitos desmetilados IL17A (en%) en una muestra, una población que probablemente se parece al conjunto de linfocitos Th17 independientemente de los procesos de estimulación: en la escala epigenética, la nueva tecnología cuantifica tanto los linfocitos Th17 estimulados como no estimulados, mientras que la citometría de flujo solo detecta los linfocitos Th17 estimulados (es decir, que producen IL17).

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Epiontis GmbH

<120> Marcador epigenético para la identificación de linfocitos T IL17 positivos en muestras complejas

<130> E31497PCT

<150> GB 1117904.1

<151> 18/10/2011

20 <160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 393

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

aagaatgaaaagaggacatggtctttaggaacatgaatctgccttccattttcctt      60
cagaaggagagattcttctatgacctcattggggcggaattttaacaaaatggtgtc    120
accctgaaccactgcgacacgccacgtaagtgaccacagaaggagaaaagccataa     180
aaagagagacgatagcgctacatcttctccatctcatagcaggcacaactcatccatcc  240
ccagttgattggaagaacaacgatgactcctgggaagacctcattggtggtgagtcctg   300
cactaacgtgcatgctcttgctgatttgaccagatagttttctggacctggtgcatg    360
aaacgctgggttctgactatggagatccaggaa                                393

```

<210> 2

<211> 142

30 <212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 700 790 T3

	<400> 2		
	tcttctataacctcattaaaaaaataatTTTtaaccaaataatcaccctaaacca	60	
	ctacaacacaccacataaataaccacaaaaaaaaaacctataaaaaaaaaacaat	120	
	aacactacattttatccatctc	142	
	<210> 3		
	<211> 207		
5	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 3		
	aaccactacaacacaccacataaataaccacaaaaaaaaaacctataaaaaaaaa	60	
	aacaataacactacattttatccatctcataacaacacaaactcatccatccccaatta	120	
	attaaaaaaaaacaataaactcctaaaaaaaaacctcattaataataaatcctacactaac	180	
	atacaatactcttactaatttaacca	207	
	<210> 4		
10	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 4		
	tcttctataacctcattaaaaaaca	25	
15	<210> 5		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 5		
20	gagatggataaaatgtagtgatt	25	
	<210> 6		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
25	<400> 6		
	accactacaacacaccacataaat	25	
	<210> 7		
	<211> 25		
	<212> ADN		
30	<213> Homo sapiens		
	<400> 7		
	ttcttataacctcattaaaaaaca	25	
	<210> 8		
	<211> 24		
35	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 8		
	atggataaaatgtagtgattgt	24	

ES 2 700 790 T3

<210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 9
 aaccactacaacacaccac a 21

 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 10
 accactacaacacaccaca ta 22

 <210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 11
 aatgagggttttttaggagttatt 24

 <210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 12
 tgagggttttttaggagtattg 23

 <210> 13
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 13
 tggtttaaattagtaagagtattgtat 27

 <210> 14
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 14
 gtttaaattagtaagagtattgtatg 27

 <210> 15
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 15
 aaaaaacaataacactacattttatccatctca 33

 <210> 16
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 45

ES 2 700 790 T3

<400> 16

tgagatggataaaatgtagtgattggttttt 33

<210> 17

<211> 1859

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 17

5

gcaggcaciaaactcatccatccccagttgattggaagaaacaacgatgactcctgggaag 60

acctcattggtgtcactgctactgctgctgagcctggaggccatagtgaagcaggaatc 120

acaatcccacgaaatccaggatgccc aaattctgaggacaagaactccccggactgtg 180

atggtcaacctgaacatccataaccggaataccaataccaatccaaaaggctcctcagat 240

tactacaaccgatccacctcaccttgg aatctccaccgcaatgaggacctgagagatat 300

ccctctgtgatctgggaggcaaagtgccgccacttgggctgcatcaacgctgatgggaac 360

gtggactaccacatgaactctgtccccatccagcaagagatcctggctcctgctgagggag 420

cctccacactgccccaaactccttccggctggagaagatactggtgtccgtgggctgcacc 480

tgtgtcaccccgattgtccaccatgtggcctaagagctctggggagcccacactcccaa 540

agcagttagactatggagagccgaccagcccctcaggaaccctcatccttcaaagacag 600

cctcatttcggactaaactcattagagttcttaaggcagtttgtccaattaagcttcag 660

aggtaacacttggccaagatatgagatctgaattacctttccctctttccaagaaggaag 720

gtttgactgagtaccaatcttctctgtttacttttttaagggtttaagttatttatg 780

tatttaatatgccctgagataactttggggtataagattccattttaatgaattacctac 840

tttattttgtttgtctttttaagaagataagattctgggcttgggaattttattattta 900

aaaggtaaaacctgtatttatttgagctatttaaggatctatttatgtttaagtatttag 960

aaaaagggtgaaaagcactattatcagttctgcctaggtaaatgtaagatagaattaat 1020

ggcagtgcaaaatcttgagctctttacaacataccggatatagtatctcctcctcttgtt 1080

tttaaaagttataaacatggctgaaaagaagattaaacctactttcatatgtattaattt 1140

aaatcttgcaatctgtgaggttttacaagagatacagcaagtctaactctctgttccat 1200

taaacccttataataaaatccttctgttaataataaagtttcaaagaaaatgtttatttg 1260

ttctcattaaatgtatcttagcaaaactcagctcttccctatgggaagagttagcaaat 1320

tctcctataagcaaaacaaagcatgtctttgagtaacaatgacctggaaataccctaaat 1380

tccaagttctcgatttcacatgccttcaagactgaacaccgactaaggtttccatactat 1440

tagccaatgctgtagacagaagcattttgataggaatagagcaaataagataatggcct 1500

gaggaatggcatgtcattatataagatcatatggggaaaatgaaacctccccaaaatac 1560

aagaagttctgggaggagacattgtcttcagactacaatgtccagtttctcccctagact 1620

caggcttcttgggagattaaggcccctcagagatcaacagaccaacatcttctcttcc 1680

tcaagcaacactcctagggcctggctctgtctgatcaaggcaccacacaaccagaaag 1740

gagctgatggggcagaacgaactttaagatgagaaaagttcagccaagtaaaataaaa 1800

actcaatcacattcaattccagagtagtttcaagtttccatogtaaccattttcgccc 1859

10

ES 2 700 790 T3

	<210> 18	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
5	<400> 18	
	attctctataacctcattaaagca	26
	<210> 19	
	<211> 26	
	<212> ADN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 19	
	ttctctataacctcattaaagcaa	26
	<210> 20	
	<211> 25	
15	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 20	
	gagatggataaaatgtagtgatt	25
	<210> 21	
20	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 21	
	gatggataaaatgtagtgattg	24
25	<210> 22	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 22	
30	ccactacaacacaccacataaat	23

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para identificar y cuantificar linfocitos T CD4 positivos IL-17 positivos en una muestra de sangre y/o tejido obtenida de un mamífero, que comprende
 - 5 a) analizar el estado de metilación de al menos una posición CpG en el gen IL-17A, en el que dicho análisis comprende una amplificación con un par de cebadores seleccionados de las SEQ ID NO: 18 y 19 como primer cebador; y las SEQ ID NO: 20 y 21 como segundo cebador, en el que una desmetilación de al menos una posición de dicha CpG en dicha muestra cuando se compara con una posición análoga en una célula sanguínea no IL-17 es indicativo de un linfocito T CD4 positivo IL-17 positivo, y
 - b) cuantificar la cantidad de linfocitos T CD4 positivos IL-17 positivos basándose en dicho análisis en la etapa a).
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el análisis del estado de metilación comprende un procedimiento seleccionado entre digestiones enzimáticas específicas de metilación, secuenciación por bisulfito, análisis seleccionado de metilación del promotor, metilación de isla CpG, MSP, HeavyMethyl, MethyLight, Ms-SNuPE u otros procedimientos que dependen de una detección de ADN amplificado.
- 15 3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende adicionalmente un análisis de los marcadores CD4, CD3, FOXP3 y/o GAPDH.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente una cuantificación de los linfocitos IL17 positivos en dicha muestra basándose en una comparación de la metilación de IL-17A con una metilación de al menos un marcador seleccionado del grupo de CD3, FOXP3 y/o GAPDH.
- 20 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho procedimiento se realiza sin una etapa de purificación y/o enriquecimiento de células, preferentemente en sangre completa y/o tejido no tripsinizado.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente la etapa de decidir sobre el estado inmunitario de dicho mamífero basándose en dichos linfocitos T identificados y/o cuantificados.
- 25 7. Un procedimiento para controlar el nivel de linfocitos T que expresan IL17 en un mamífero, que comprende un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y que compara la cantidad de linfocitos T IL17 positivos identificados con una muestra anterior tomada del mismo mamífero, y o con una muestra de control.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho mamífero padece o es probable que padezca enfermedades mediadas por IL-17 y efectos secundarios de terapias anti-IL-17, tales como,
 - 30 por ejemplo, enfermedades psoriásicas, psoriasis, artritis psoriásica, enfermedades reumáticas como, por ej. artritis reumatoide, esclerosis múltiple, arteriosclerosis, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedades inflamatorias, uveítis, enfermedades de hepatitis, lupus, enfermedades pulmonares (p.ej. asma), síndrome hiper IgE, inmunidad antitumoral, lesiones renales, shock endotóxico por infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas, parasitarias) y enfermedades autoinmunitarias, infecciones víricas o
 - 35 bacterianas, rechazos de trasplantes, cáncer, incluidos los cánceres sólidos y no sólidos, y/o la alergia o cualquier enfermedad directamente relacionada con linfocitos T que expresan IL-17.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende adicionalmente medir y/o controlar la cantidad de dicha cantidad de linfocitos T que expresan IL-17 en respuesta a sustancias químicas y/o biológicas proporcionadas a dicho mamífero.
- 40 10. El uso de un kit que comprende materiales para realizar el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para identificar, cuantificar y/o controlar linfocitos T CD4 positivos IL-17 positivos en una muestra de sangre y/o tejido obtenida de un mamífero.

Figura 1

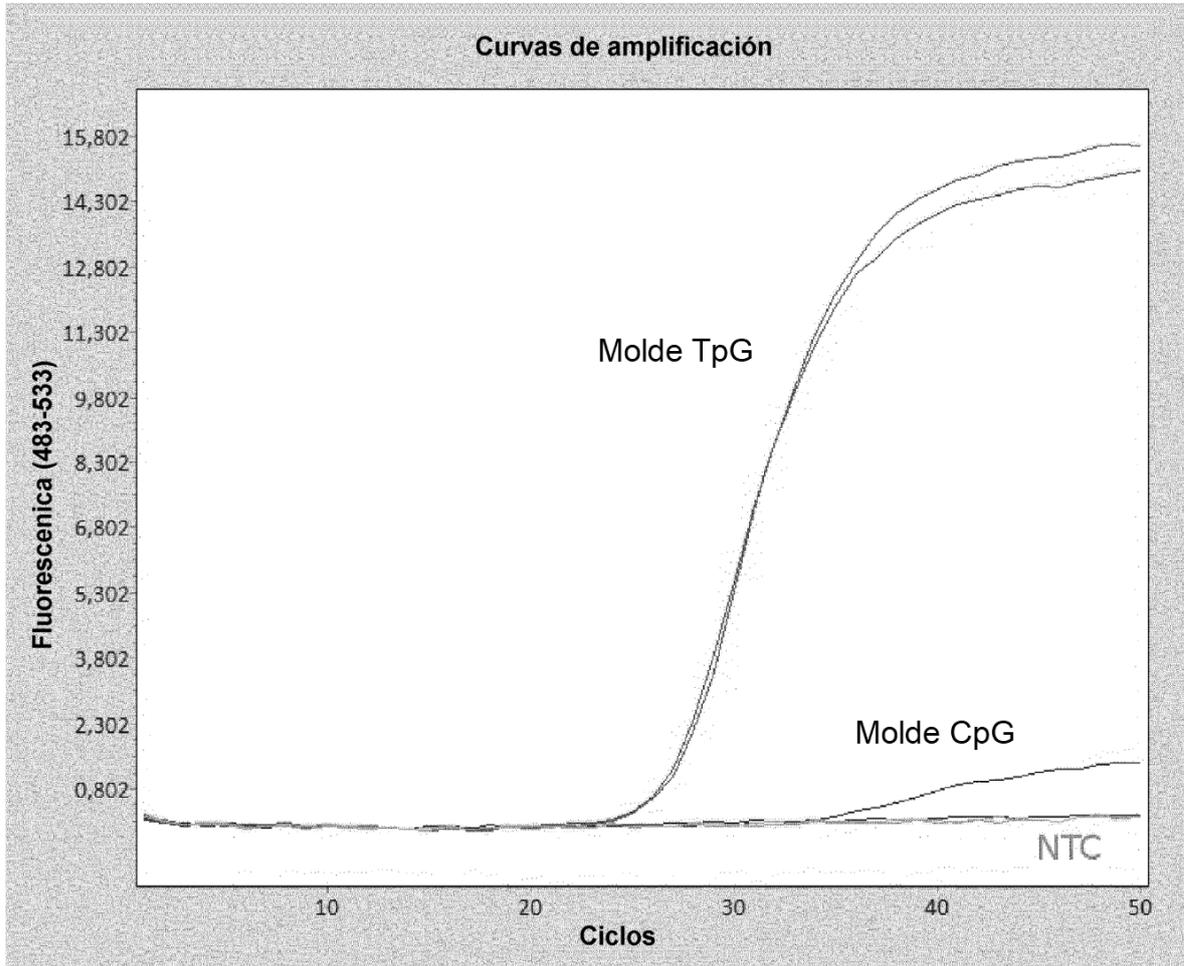


Figura 2

A

5' AAGAATGAAAAGAGGACATGGTCTTTAGGAACATGAATTTCTGCCCTTCCCATTTTCCTTC
AGAAGGAGAGATTCTTCTATGACCTCATTGGGGGCGGAAATTTTAACCAAATGGTGTCCACC
CCTGAACCCACTGCGACACGCCACGTAAGTGACCACAGAAGGAGAAAAGCCCTATAAAAAGA
GAGACGATAGCGCTACATTTTGTCCATCTCATAGCAGGCACAACTCATCCATCCCCAGTTG
ATTGGAAGAAACAACGATGACTCCTGGGAAGACCTCATTGGTGGTGAGTCTGCACTAACGT
GCGATGCTCTTGCTGATTTGGACCAGATAGTATTTCTGGACCCGTGGGCATGAAACCGCTGGGT
TCTGACTATGGAGATCCAGGAA^{3'}

B

5' TCTTCTATAACCTCATTAAAAACAAAATTTTAACCAAATAATATCACCCCTAAACCCAC
TACAACACACCACATAAATAACCACAAAAAAAAAAAAAAAAACCCTATAAAAAAAAAAACAATAAC
ACTACATTTTATCCATCTC^{3'}

C

5' AACCCACTACAACACACCACATAAATAACCACAAAAAAAAAAAAAAAAACCCTATAAAA**AAAAAAA**
ACAATAACACTACATTTTATCCATCTCATAACAAACACAACTCATCCATCCCCAATTAATT
AAAAAAAAACAATAACTCCTAAAAAAAAACCTCATTAAATAAATCCTACACTAACATACA
ATACTCTTACTAATTTAAACCA^{3'}

Figura 3

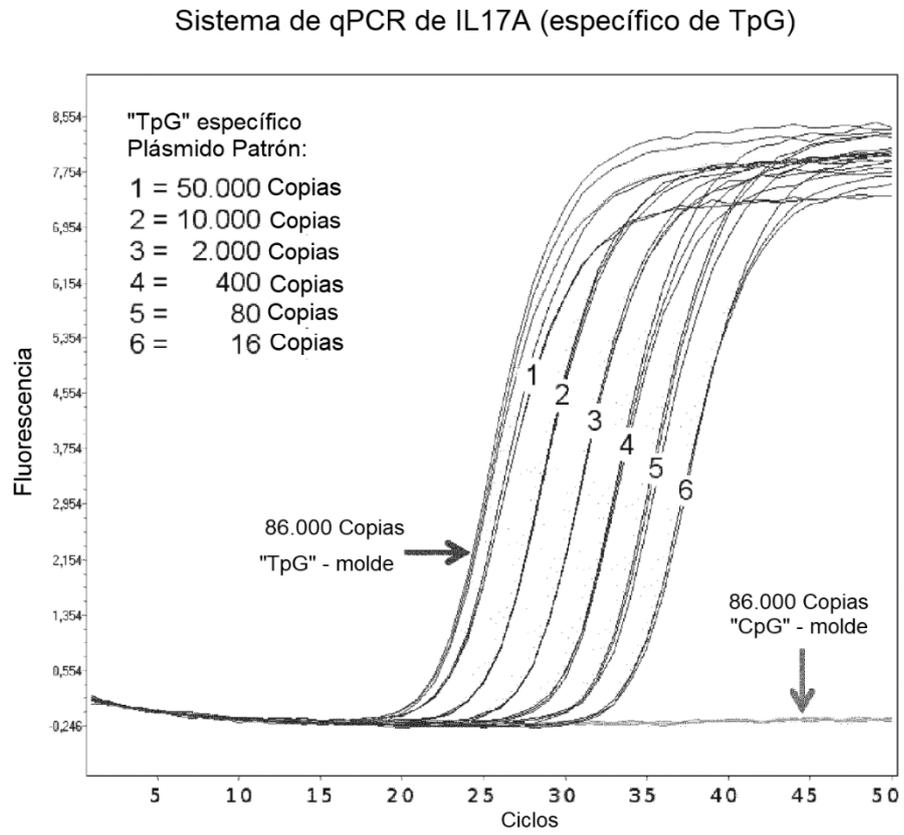
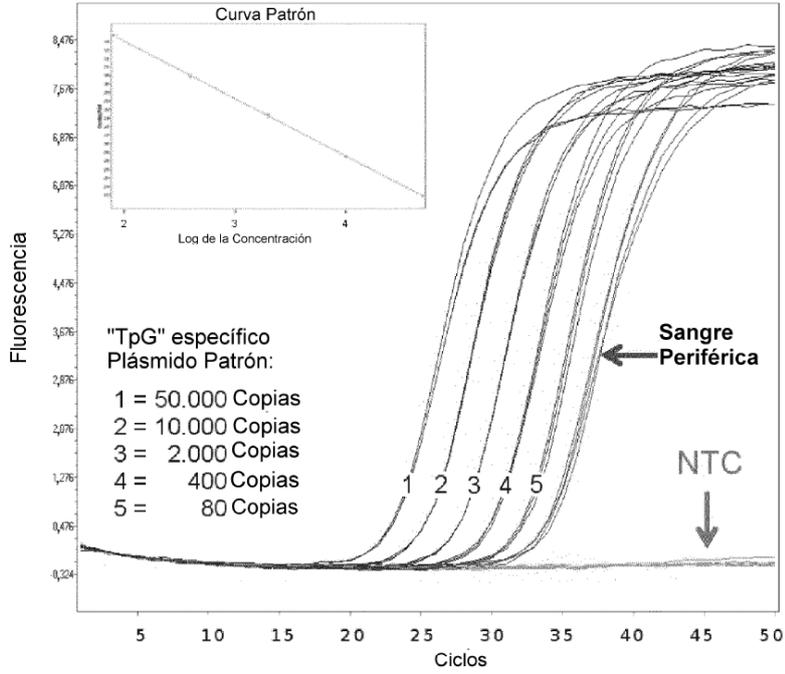


Figura 4

Sistema de qPCR de IL17A (específico de TpG)



Sistema de qPCR de GAPDH (específico de TpG)

