

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 077**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6881** (2008.01)

**C12Q 1/6883** (2008.01)

**C12Q 1/6886** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2015 PCT/EP2015/078725**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16087663**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2015 E 15805467 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3227458**

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

30 Prioridad:

**05.12.2014 EP 14196613**

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

**30.06.2020**

73 Titular/es:

**EPIONTIS GMBH (100.0%)  
Barbara-McClintock-Straße 6  
12489 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**OLEK, SVEN y  
HOFFMÜLLER, ULRICH**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 770 077 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 de CpG en la región génica de mamífero para el factor inhibidor de la leucemia (LIF, siglas del inglés *leukemia inhibitory factor*), 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 y 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 (convertibilidad por bisulfito) de al menos una posición de CpG en la región génica de mamífero para el factor inhibidor de la leucemia (LIF), en el que dicha al menos una posición de CpG se selecciona de las posiciones de 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.º 2305 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).

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 y no convertible por bisulfito está particular e incluso exclusivamente limitado 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 La región genómica como la que se analiza en la presente invención, comprende el amplicón n.º 2305 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, y opcionalmente incluye más de aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 800, 900, o 1000 bases, o incluso 1500 o 2000 bases hasta un máximo de aproximadamente 2200 bases adicionales corriente arriba del amplicón AMP2305, y/u opcionalmente incluye más de aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700800, 900 o 1000 bases, o incluso 1500, 2000 o 2500 bases hasta un máximo de aproximadamente 2600 bases adicionales corriente abajo. En otras palabras, la longitud de la región genómica analizada que comprende el amplicón AMP2305 (aproximadamente 500 bases) puede ser de aproximadamente 600, 700, 800, 900, 1000 o 1500 bases hasta aproximadamente 5300 bases.

55 La región genómica más preferida es la que comprende la secuencia de AMP2305, y además la secuencia que incluye los tres motivos CpG corriente arriba de la misma y 10 de los motivos CpG corriente abajo de la misma (como se indica en la Figura 3). Más preferentemente, la región genómica corriente abajo incluye todos los motivos CpG como se muestra en la Figura 3.

En el contexto de la presente invención, la expresión "aproximadamente" significará el valor indicado +/- 10 %.

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.

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.

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).

Dicho análisis de convertibilidad por bisulfito, como se desvela, comprende preferentemente 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 las SEQ ID NO: 2 a 4, como se ha mencionado anteriormente. 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 de CpG con el fin de minimizar la cantidad de sitios a analizar, por ejemplo al menos una de las posiciones de CpG seleccionadas de una posición de CpG en un amplicón de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 seleccionada de entre las posiciones de 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 suficientes datos e/o información para ser informativos en el contexto de la presente invención.

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

Con el fin de analizar la convertibilidad por bisulfito de las posiciones de 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 bibliografía respectiva.

5 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 bibliografía 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.

10 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 otros linfocitos T auxiliares, y otros tipos de células procedentes de otros órganos además de la sangre.

15 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.

20 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.

25 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 cartilago-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 ampolloso, 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.

30 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.

35 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.

40 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.

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 de CpG seleccionadas de entre las posiciones de 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.º 2305 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 para identificar, cuantificar, y/o monitorizar linfocitos T auxiliares foliculares en un mamífero.

La presente divulgación 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.

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 bisulfita 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:

$$\text{Relación de biomarcadores} = a/b$$

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

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

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

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.

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.

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.

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.

5 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 de 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; linfocitos T auxiliares act.= linfocitos T auxiliares activados; o TFH (peri) = linfocitos T auxiliares foliculares (periféricos), para identificar linfocitos T auxiliares foliculares, respectivamente.

La Figura 3 muestra la SEQ ID NO: 5, con el amplicón AMP2305 de acuerdo con la presente invención indicado en negrita, y los motivos de CpG relevantes subrayados.

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.

10 La SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia genómica de la región de interés, con las aproximadamente 2200 bases corriente arriba del amplicón AMP2305, y las aproximadamente 2600 bases corriente abajo.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1**

15 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):

CTTCTGCCCCTCAGTACACAGCCCAGGGGGAGCCGTTCCCCAACAACTGGACAA  
 GCTATGTGGCCCAACGTGACGGACTTCCCGCCCTTCCACGCCAACGGCACGGAG  
 AAGGCCAAGCTGGTGGAGCTGTACCGCATAGTCGTGTACCTTGGCACCTCCCTGG  
 GCAACATCACCCGGGACCAGAAGATCCTCAACCCCAGTGCCCTCAGCCTCCACAG  
 CAAGCTCAACGCCACCGCCGACATCCTGCGAGGCCTCCTTAGCAACGTGCTGTGC  
 CGCCTGTGCAGCAAGTACCACGTGGGCCATGTGGACGTGACCTACGGCCCTGACA  
 CCTCGGGTAAGGATGTCTTCCAGAAGAAGAAGCTGGGCTGTCAACTCCTGGGGA  
 AGTATAAGCAGATCATCGCCGTGTTGGCCAGGCCTTCTAGCAGGAGGTCTTGAA  
 GTGTGCTGTGAACCGAGGGATCTCAGGAGTTGGGTCCAGATGTGGGGGCCTGTCC  
 AA

Para la RCPc se usaron los siguientes cebadores y sonda:

Cebador directo	q2305_TFH_dir	GTTTAATGTTATTGTTGATATTTTGT (SEQ ID NO: 2)
Cebador inverso	q2305_TFH_inv	ACATCCACATAACCCACA (SEQ ID NO: 3)
Sonda	q2305_THF_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

(continuación)

Tipo de células sanguíneas inmunes	Caracterización FACS	Tejido	Porcentaje de linfocitos THF (%)
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
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 de 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):

	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

5 Se realiza un análisis similar usando las posiciones de CpG que se encuentran en aproximadamente 2200 bases corriente arriba y/o en aproximadamente 2600 bases corriente abajo del amplicón AMP2305 (véase la SEC ID NO: 5), por lo que se identifican posiciones de CpG informativas adicionales.

## LISTADO DE SECUENCIAS

&lt;110&gt; Epiontis GmbH

&lt;120&gt; Procedimiento epigenético para la identificación de linfocitos T auxiliares foliculares (THF)

10 &lt;130&gt; E31776WO



<150> EP14196613.5  
 <151> 05-12-2014

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1  
 <211> 496  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 1

```

cttctgcccc tcagtacaca gcccaggggg agccgttccc caacaacctg gacaagctat      60
gtggcccaaa cgtgacggac ttcccgcctt tccacgcaa cggcacggag aaggccaagc      120
tgggtggagct gtaccgcata gtcgtgtacc ttggcacctc cctgggcaac atcaccggg      180
accagaagat cctcaacccc agtgcctca gcctccacag caagctcaac gccaccgccc      240
acatcctgcg aggctcctt agcaacgtgc tgtgccgcct gtgcagcaag taccacgtgg      300
gccatgtgga cgtgacctac ggccctgaca cctcgggtaa ggatgtcttc cagaagaaga      360
agctgggctg tcaactcctg gggaagtata agcagatcat cggcgtgttg gcccaggcct      420
tctagcagga ggtcttgaag tgtgctgtga accgagggat ctcaggagtt ggggccagat      480
gtgggggcct gtccaa      496
    
```

15 <210> 2  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2  
 gtttaatgtt attgtgata tttgt 26

20 <210> 3  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3  
 acatccacat aaccaca 18

25 <210> 4  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 4  
 tgtgtgtgt tgttgtgta gtaagtatta t 31

35 <210> 5  
 <211> 5531  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 770 077 T3

ctgaggatgg gtcccatggg gccaaagtcca ggctgggtgg gagagcgact cagagccagg 60  
 gccgcaaggt gggcctggca cagagctccc aagtccacag ggagatgagg tgatggggoga 120  
 gtcagccggg cccccgggt ggaatcagca actctggttt ccagacaagt ttgtctttct 180  
 cgaagcccat cctgggggaa tgcagccagc cccaagctaa gccggatgaa gcaggaagga 240  
 gaaggcagtc cctgcatcct ggacaagggt gagtgtggcc cacatctcaa cagccacatc 300  
 ctcgtcttgc tgttgggatg gacagatgga caactccggg ccgcaccctc caccocaaacc 360  
 ccaggcctca ggacctgcct gcacactgcc cacgcgccat ccaggtaaag tgcttagaga 420  
 gcgacagga aaggtgcaaa gtgagtgaaa agtaccataa ttagtaccat catcttgtcg 480  
 gaggaacttg gaggccggca gcccgctcag ggtttgagaa gaagccagaa cactgctctg 540  
 agcagctgcc ccaactctgc tgccctcttc cctcccctgc tctcagactg gagggcgttt 600  
 ctccactcgc ctggccccag cacaaggaa gagatcgggt tcctgcctg ggagcccaga 660  
 catgggtggg agtgggatgg ggggtggagca ggagggccca cagcttctctg gtctgagtcc 720  
 caggcatctg cagcctcctt ctctctctct tgggagcaat gggcagctga tccccccagt 780  
 ctaccccacc ttctgggggt ctggcccagc caggcccccc gcaccgtcta tgggtgtccg 840  
 ggccacagga ggagcttccc tgctgtgtcg gagcatgctg ggtgcagggg cagggttggt 900  
 ccagggcgct atttcagagg cagcatgggg acacagaaac aaggacaggg tgggccacaa 960  
 ggactgtctt gccactgct ccagggggca caatatctgc caggaacagt gcgcctcaca 1020  
 acacaatgct ggggcgcccc agaacagtgt gaaccagccc cctggaatca agacagaaag 1080  
 gcacccggcc tctccacaaa ttggcccagc cctgcagcc tggaccctga caccctaaag 1140  
 caagtcacag taggggatgg ggggggggtg agcaaggccc cccactccca ctcaggcctc 1200  
 cccattctct cagatcggac ccttctctga gcttcacccg taaggcttat tccacttgta 1260  
 acattgtcga cttccagacc aggcctgct aagccctggc cctggcgctt gtgtcgggag 1320  
 ccatcatcat attttgttga gtagggacca gggaaagggg aattaacttg gccactgaaa 1380  
 gcaccaataa gttaatataa ataggatata ataataaata gaaatcatgc caggtcagac 1440  
 gcacagcacg cttggagctc agggttccct gagaccctga ccctaagttc tgctgttccc 1500  
 ttgccctggg gaccagagac ggcctccagt cccctcaag tacctctgtg tgacctcaca 1560

ES 2 770 077 T3

aggcctccca gggcctcaga tgtgagctgc tactctgagc taccacagcc ccttcttaca 1620  
 gacctttacc cagaggaaga gcctgggtcc ctcagaacct ctgcacctga cttagcaacc 1680  
 tgcccctgcc ctaccacact ccacaaaacc ctgctgcagg tccagccatc agaccctggc 1740  
 catcccaggc tgcagggaaag atcacgggga agagaacgaa gaacctacca aagctttcca 1800  
 ggcctctcct cctcccagtg tcttcottcc caggcctgaa ggtggcttct ctgcctcccc 1860  
 aagagcctga atgccaagtg acctccttct ggaaacttct gccagattgt tcctatgccc 1920  
 aagttctctg atcatcctca aaagaagaca gccttccatc ccagaggccc ctctctatct 1980  
 tccactcatc aaacttctag gggacaagga gtcctttggg atcctagccc ctctggccca 2040  
 cctaagtccc aacctaaagg gcagcaaagg cacagatggt gataatttgc tgggggctgg 2100  
 tccactcccc tgggcccctgc tgtctcaccc tgtggtcagg gctctttagt atgacttgtg 2160  
 tagtttgttc actgcacaaa gtgagcaagg ggccaaaggg acaagtagag gcagaagtcc 2220  
 agcccacgct ccccagtcca caatctccc gaggaagggg caccttcttc tagctccctc 2280  
 cctatggaag tttccactct gctcagcttc atcacagccc agcccagagt ggagtggact 2340  
 gggcaggcac cctcggggtc tgccagcagc cccatttgg gtttagcgat gccctgggcc 2400  
 ccagccaccc ttggacaggc cccacatct ggacccaact cctgagatcc ctcggttcac 2460  
 agcacacttc aagacctcct gctagaaggc ctgggccaac acggcgatga tctgcttata 2520  
 cttccccagg agttgacagc ccagcttctt cttctggaag acatccttac ccgaggtgtc 2580  
 agggccgtag gtcacgtcca catggcccac gtggtacttg ctgcacagge ggcacagcac 2640  
 gttgctaagg aggcctcgca ggatgtcggc ggtggcgttg agcttgctgt ggaggctgag 2700  
 ggcactgggg ttgaggatct tctggtcccg ggtgatgttg cccagggagg tgccaaggta 2760  
 cacgactatg cggtacagct ccaccagctt ggccttctcc gtgccgttgg cgtggaaggg 2820  
 cgggaagtcc gtcacgttgg ggccacatag cttgtccagg ttggtgggga acggctcccc 2880  
 ctgggctgtg tactgagggg cagaagggag gtgacgtggg agtcaggggt cagtgtccca 2940  
 gccctgccgc caaccctttg ggcaagctct tgcgtctggt tccccatcta gcgcatgagg 3000  
 acccaactcc ttgccctgta agcatctgga attgtcatga gagccaaaac taattgtaat 3060  
 gtgagtgcc ttgctaaaga tcaaagactg agccatgcac gcagtcatca ttatcatcat 3120  
 catcatcatc accaccctaa ggggacagaa gggaaaactc ggtgtctagc cctagctggg 3180  
 gcaccacaca caagtacttc catccctgca ctcaaatgt tccgggacgc ccctccatgc 3240  
 ccagcaccca cagcccactg cctctcaacc gcctctccct ggtgcctcac gccatttcc 3300  
 cctccatccc tcgctccctg cagcaggaca atcacaagat aagaagtgcc aggtccccac 3360  
 ctttgcactc agttctcccc ttgctaactg ggcaccctgg ggaagcttcc ctggggaagc 3420

ES 2 770 077 T3

ttgggcagga agtggcggga gctctgggggt ggtttaatca agccctctcc ccattctctc	3480
cttcagccc caaaaggtcc cctcaacca gatcaggaca gccctaag atatttacia	3540
gccccctccc tgccatctcc tgtcagtatc ccaggggtaa cttacataga gaataaagag	3600
ggcattggca ctgccattga gctgtgccag ttggctcctg atctggttca tgaggttgtt	3660
gtgacatggg tggcgtatgg cacaggtggc gttgacaggg gtgatgggga gggggctccc	3720
cgccccatgt ttocagtgca gaaccaacag caggggcaca actcctgggg acagtcagga	3780
agaagccatg agtagaaagg caggaaaggg tggcctgggg tcatggcaca ccggatgggg	3840
gtccaacaat ggccgcatgg gagaggactc ctggttcccc ctcaccacct gcagctgtct	3900
tcctggggcc tagtcttcac tctgtcactg cgtgtgtttc tctgtctccc tttctctacc	3960
ttagttctcc ctgctctctt ctgggatgac gtaaagatga gggcaagaca caagccattt	4020
ccacccaaag ggtgcagggc ccaggagaga ctcccagcca tcccaccctt tcctcagga	4080
aggcaaaggt cctaaggccc cctggccctc tggctggaag gcaccaggcc ccaggcccag	4140
caggcaccag gagaaggag accctctctt tcccacctcc cgtggtggcc caggttcctc	4200
agcagcgtt cccactcact ggcccatgc agcccaaatc tccgaagcca ggcacccatg	4260
ggggccacgg ggcattgggg agtggggagg agtcctcggc tgaccctcat ctccctccca	4320
aacctgccac ttgattctgg ctccctgggc caattgcccc caattctgcc ccgccccca	4380
tcactctcta tctcttctt cctagtgtc ccctatctca ctcaagctca cccatttct	4440
gcctggtgt cccactctc catccccaaa tcattattca aaactctctg ttccccagc	4500
tccggacagc cctgactcc atgccttctc ccgactcctc cgtgtccct tgtcccagg	4560
gttccctcc ctccaaacac acacacaccg gctcaggag ggagaggaaa tggcaccaca	4620
ggagagagaa aaggcaaaag gtcataggca gtcgggtggg cggggaggaa ggaaagtga	4680
aggtgacagg agagctggga gctgtcccga catgtcctgg tttgcccctc cccaggggg	4740
gcctgttctc ccgactcccc ccaggcccc ttagacgctt ttccagggct ctgcagaagg	4800
gcacctgaag atggtggggg ccggggtcag cgggcgagtg aggctggaga cctcccccg	4860
atccccatg ctggaacagc ggggacaggg gcctcctcaa gttcacttct cctgggtccc	4920
ctgttctcc cagcatccca aggcagtgtc gaggccccgg ggtggctgcg ggaggggggc	4980
cacacccta tatctcacct agcgcagacc acacgcttcc agacaccagc agatggaggc	5040
ggcacctgct ccggtcccag gccggagttt gcaagctgct cgcgcgccgc gccctccct	5100
gggagcagcc cgggaccgcg gttggaaagg agaaagcga aagaaagaaa gaaaagaaa	5160
agagagaggg agagtgaatc tgggagaaag cgcagaggga agagcagcca gcgagtgtcc	5220
ggagcgagga ggaggaggag gagaaggaga gggggaagaa gaggaggagg aggaaggtc	5280
ggcgcacct cctcgcgc caacctgcc cggggcgtgc ggtgcttggg accatgtgcc	5340

ES 2 770 077 T3

cgcgctcgct	cggggcggcc	accagcgcc	tccggtggt	gcgcgggcgc	cccaagtgtt	5400
cgtgtgtctg	cggcgggtgg	ggtccggct	cgcgctgcca	agcgcccaa	gttgccgccg	5460
cgccccgcag	cggggacgcg	aagccggcgc	ggggcgggtg	tattacctg	ccgccaagac	5520
cttcattatg	g					5531

## 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 de CpG en la región génica de mamífero para el factor inhibidor de la leucemia (LIF), en el que dicha al menos una posición de CpG se selecciona de las posiciones de 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.º 2305 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.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un procedimiento seleccionado de una digestión enzimática específica de metilación, secuenciación por bisulfito, metilación de isla CpG, MSP, HeavyMethyl, MethyLight, Ms-SNuPE, y 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 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.
- 20 4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 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.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una distinción de dichos linfocitos T auxiliares foliculares de todos o de al menos uno de los tipos de células seleccionadas de linfocitos B, linfocitos T citotóxicos, granulocitos, monocitos, linfocitos NK y otros linfocitos T auxiliares.
- 25 6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 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.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además la etapa de decidir sobre el estado inmune de dicho mamífero basándose en dichos linfocitos T auxiliares foliculares identificados.
- 30 8. 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 3 a 7, y comparar dicha cantidad relativa de dichas células identificadas con una muestra tomada anteriormente o en paralelo del mismo mamífero, y/o una muestra de control.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 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.
- 35 10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho mamífero padece o es probable que padezca enfermedades autoinmunes, rechazos de trasplantes, enfermedades infecciosas, cáncer y/o alergia.
- 40 11. Uso de un kit que comprende a) un reactivo de bisulfito, y b) materiales para el análisis del estado de metilación de las posiciones de CpG seleccionadas de las posiciones de 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.º 2305 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, para identificar, cuantificar, y/o monitorizar linfocitos T auxiliares foliculares en un mamífero.

Figura 1

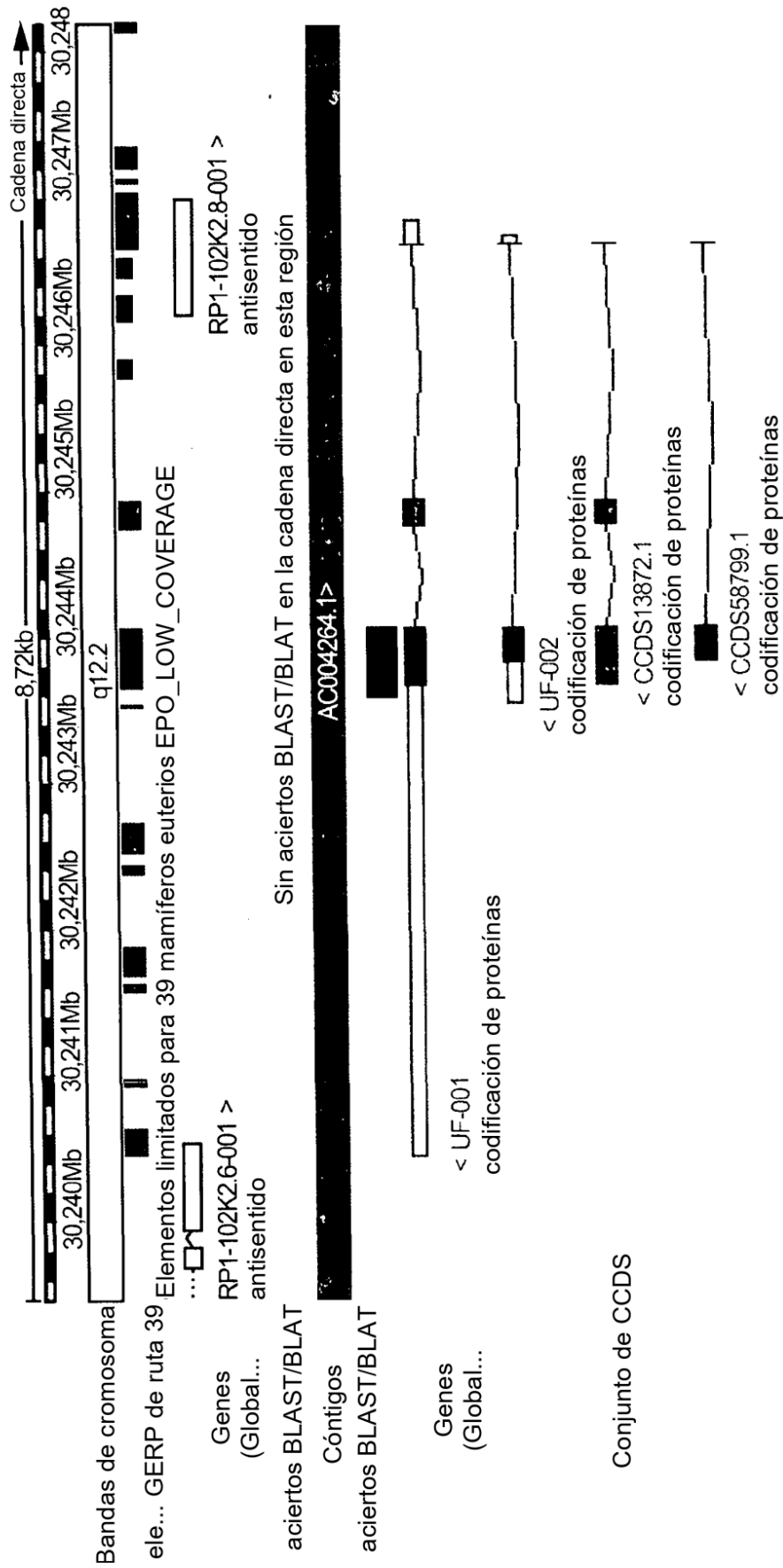


Figura 2

Linfocitos B  
Linfocitos T citotóxicos  
Granulocitos  
Monocitos  
Linfocitos NK  
Linfocitos TFH (1)  
Linfocitos TFH (2)  
Linfocitos T auxiliares  
Linfocitos T auxiliares activados  
Linfocitos TFH (1) periféricos  
Linfocitos TFH (2) periféricos  
Linfocitos TFH (3) periféricos  
Linfocitos TFH (4) periféricos  
Linfocitos TFH (5) periféricos  
Linfocitos TFH (6) periféricos  
Linfocitos TFH (7) periféricos

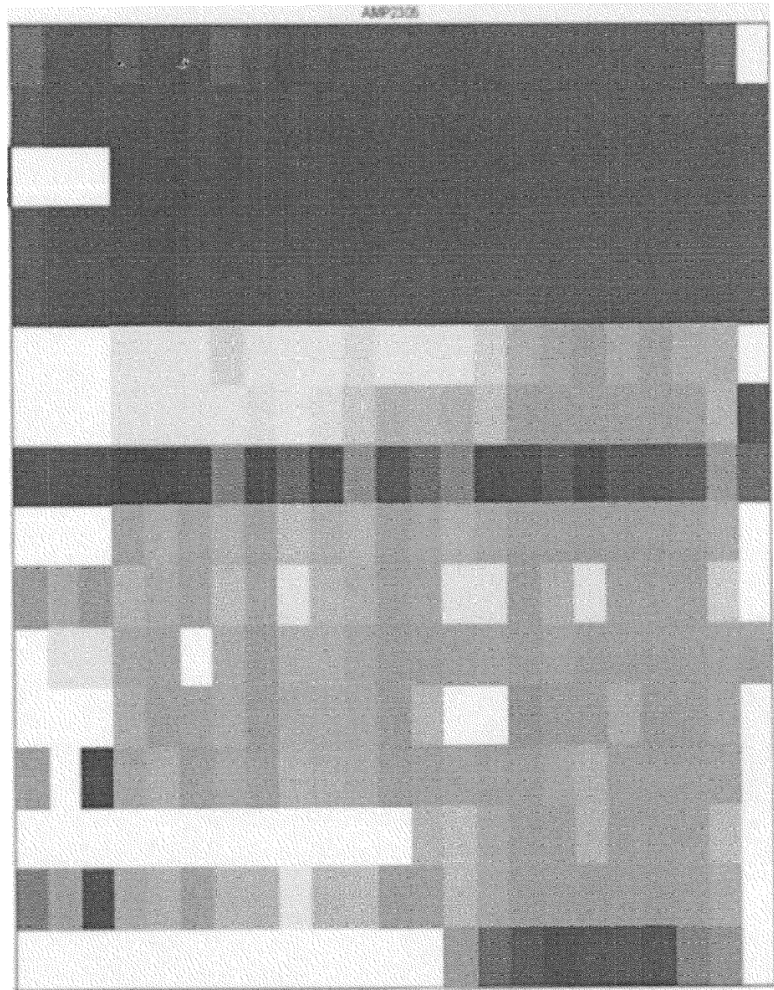




Figura 3

CTGAGGATGGGTCCCATGGGGCCAAGTCCAGGCTGGGTGGGAGAGCGACTCAGAGCCAGGGCCG  
 CAAGGTGGGCCTGGCACAGAGCTCCCAAGTCCACAGGGAGATGAGGTGATGGGCGAGTCAGCCG  
 GGCCCCCGGGTGAATCAGCAACTCTGGTTTCCAGACAAGTTTGTCTTTCTCGAAGCCCATCC  
 TGGGGGAATGCAGCCAGCCCCAAGCTAAGCCGGATGAAGCAGGAAGGAGAAGGCAGTCCCTGCA  
 TCCTGGACAAGGGTGAAGTGTGGCCACATCTCAACAGCCACATCCTCGTCTTGTGTTGGGATG  
 GACAGATGGACAACTCCGGGCCGCACCCTCCACCCCAACCCCAAGGCTCAGGACCTGCCTGCAC  
 ACTGCCACGCGCCATCCAGGTAAAGTGCTTAGAGAGCGACAGGGAAAGGTGCAAAGTGAAGTGA  
 AAAGTACCATAATTAGTACCATCATCTTGTCCGGAGGAACCTTGGAGGCCGGCAGCCCCGCTCAGGG  
 TTTGAGAAGAAGCCAGAACAAGTGTCTGAGCAGCTGCCCAACTCTGCTGCCTCCTTCCCTCCC  
 CTGCTCTCAGACTGGAGGGCGTTTCTCCACTCGCCTGGCCCCAGCACAAAGGAAGAGATCGGGT  
 TCCCTGCCTGGGAGCCCAGACATGGGTGGGAGTGGGATGGGGGTGGAGCAGGAGGGCCACAGC  
 TTCCTGGTCTGAGTCCCAGGCATCTGCAGCCTCCCTCTCCTCCTTGGGAGCAATGGGCAGCT  
 GATCCCCCAGTCTACCCACCTTCCCTGGGGTCTGGCCAGCCAGGCCCCCCCGCACCGTCTATG  
 GGTGTCCGGGCCACAGGAGGAGCTTCCCTGCTGTGTCCGGAGCATGCTGGGTGCAGGGGCAGGGT  
 TGTTCCAGGGCGCTATTTCCAGAGGCAGCATGGGGACACAGAAACAAGGACAGGGTGGGCCACAA  
 GGACTGTCTTGCCACTGCTCCAGGGGGCACAATATCTGCCAGGAACAGTGCCTCACAACAC  
 AATGCTGGGGCGCCCAAGAACAGTGTGAACCAGCCCCCTGGAATCAAGACAGAAAGGCACCCGG  
 CCTCTCCACAAATTTGGCCCAGCCCCCTGCAGCCTGGACCCTGACACCCTAAAGCAAGTCACAGTA  
 GGGGATGGGGGGGGTGGAGCAAGGCCCCCACTCCCACTCAGGCCTCCCCATTCTCTCAGATC  
 CGACCCTTCTCTGAGCTTACCCGTAAGGCTTATCCACTTGTAACATTTGTGACTTCCAGACC  
 AGGCCCTGCTAAGCCCTGGCCCTGGCGCTTGTGTCCGGAGCCATCATCATATTTTGTGAGTAG  
 GGACCAGGGAAAGGGGAATTAAGTGGCCACTGAAAGCACCAATAAGTAAATATAAATAGGATA  
 TCATAATAAATAGAAATCATGCCAGGTCAGACGCACAGCACGCTTGGAGCTCAGGGTTCCCTGA  
 GACCCTGACCCTAAGTTCTGCTGTTCCCTTGGCCCTGGGGACCAGAGACGGCCTCCAGTCCCCCT  
 CAAGTACCTCTGTGTGACCTCACAAGGCCTCCCAGGGCCTCAGATGTGAGCTGCTACTCTGAGC  
 TACCCAGCCCCCTTCTTACAGACCTTTACCCAGAGGAAGAGCCTGGGTCCCTCAGAACCTCTGC  
 ACCTGACTTAGCAACCTGCCCTGCCCTACCCACCTCCACAAACCCCTGCTGCAGGTCCAGCCA  
 TCAGACCCTGGCCATCCCAGGCTGCAGGGAAGATCACGGGGAAGAGAACGAAGAACCTACCAAA  
 GCTTTCCAGGCCTCTCCTCCTCCCAGTGTCTTCCCTTCCAGGCCTGAAGGTGGCTTCTCTGCCT  
 CCCAAGAGCCTGAATGCCAAGTGACCTCCTTCTGGAACTTCTGCCAGATTGTTCCCTATGCC  
 AAGTTCTCTGATCATCCTCAAAGAAGACAGCCTTCCATCCCAGAGGCCCTCTCTATCTTCCA  
 CTCATCAAACCTTCTAGGGGACAAGGAGTCCTTTGGGATCCTAGCCCCCTTGGCCCACCTAAGTC  
 CCAACCTAAGGGGCAGCAAAGGCACAGATGGTGATAATTTGCTGGGGGCTGGTCCACTCCCCTG  
 GGCCCTGCTGTCTCACCTGTGGTCAGGGCTCTTGTAGATGACTTGTGTAGTTTGTTCACTGCA  
 CAAAGTGAGCAAGGGGGCCAAAGGGACAAGTAGAGGCAGAAGTCCAGCCCACGCTCCCCAGTCCA  
 CAATCTCCCAGAGGAAGGGGCACCTTCTTCTAGCTCCCTCCCTATGGAAGTTTCCACTCTGCTC  
 AGCTTCATCACAGCCCAGCCCAGAGTGGAGTGGACTGGCCAGGCACCCCTCGGGGTCTGCCAGCA  
 GCCCCATTTGGGTTTAGCGATGCCCTGGGCCCCAGCCACCC**TGGACAGGCCCCACATCTGG**  
**ACCCA**ACTCCTGAGATCCCTCGGTT**CACAGCACACTTCAAGACCTCCTGCTAGAAGGCCTGGGC**  
**CAACACGGCGATGATCTGCTTATACTTCCCAGGAGTTGACAGCCAGCTTCTTCTTCTGGAAG**  
**ACATCCTTACCCGAGGTGTCAGGGCCGTAGGTCACGTCCACATGGCCACGTGGTACTTGTGTC**  
**ACAGGCGGCACAGCACGTTGCTAAGGAGGCCTCGCAGGATGTCCGGCGGTGGCGTTGAGCTTGT**  
**GTGGAGGCTGAGGGCACTGGGGTTGAGGATCTTCTGGTCCCGGGTGAATTTGCCAGGGAGGTG**  
**CCAAGGTACACGACTATGCGGTACAGCTCCACCAGCTTGGCCTTCTCCGTGCCGTTGGCGTGA**  
**AGGGCGGGAAGTCCGTACGTTGGGGCCACATAGCTTGTCCAGGTTGTTGGGGAAACGGCTCCCC**  
**CTGGGCTGTGTA**CTGAGGGGC**GAGAAG**GGAGGTGACGTGGGAGTCAGGGGTGAGTGTCCCAGCCC  
 TGCCGCCAACCTTTGGGCAAGCTCTTGGCTCTGTTTCCCCATCTAGCGCATGAGGACCCAACT  
 CCTTGGCCCTGTAAGCATCTGGAATTGTCATGAGAGCCAAAATAATTGTAATGTGAGTGCCTT  
 GCTAAAGATCAAAGACTGAGCCATGCACGCAGTCATCATTATCATCATCATCATCACCACC

CTAAGGGGACAGAAGGGAAAACTCGGTGTCTAGCCCTAGCTGGGGCACCACACACAAGTACTTC  
 CATCCCTGCACTCACAATGTTCCGGGACGCCCCCTCCATGCCCAGCACCCACAGCCCACTGCCTC  
 TCAACCGCATCTCCCTGGTGCCTCAGCGCCATTTCCCTCCATCCCTCGCTCCCTGCAGCAGGA  
 CAATCACAAGATAAGAAGTGCCAGGTCCACACCTTTGCACTCAGTTCTCCCTTGCTAACTGGG  
 CACCCTGGGGAAAGCTTCCCTGGGGAAAGCTTGGGCAGGAAGTGGCGGGAGTCTGGGGGTGGTTTA  
 ATCAAGCCCTCTCCCATTTCTCTCCTTCCAGCCCCAAAAGGTCCCCTCAACCCAGATCAGGACA  
 GCCCCTAATGATATTTACAAGCCCCCTCCCTGCCATCTCCTGTCAGTATCCCAGGGGTAACTTA  
 CATAGAGAATAAAGAGGGCATTGGCACTGCCATTGAGCTGTGCCAGTTGGCTCCTGATCTGGTT  
 CATGAGGTGTGTGACATGGGTGGCGTATGGCACAGGTGGCGTTGACAGGGGTGATGGGGAGG  
 GGGCTCCCCGCCCATGTTTCCAGTGCAGAACCAACAGCAGGGGCACAACTCCTGGGGACAGTC  
 AGGAAGAAGCCATGAGTAGAAAGGCAGGAAAGGGTGGCCTGGGGTCATGGCACACCGGATGGGG  
 GTCCAACAATGGCCGCATGGGAGAGGACTCCTGGTTCCCCCTCACCACCTGCAGCTGTCTTCCT  
 GGGGCTAGTCTTCACTCTGTCACTGCGTGTGTTTCTCTGTCTCCCTTTCTCTACCTTAGTTCT  
 CCCTGCTCTCTTCTGGGATGACGTAAAGATGAGGGCAAGACACAAGCCATTTCCACCCAAAGGG  
 TGCAGGGTCCAGGAGAGACTCCAGCCATCCCACCCTTTCCCTCAGGAAGGCAAAGGTCCTAAG  
 GCCCCCTGGCCCTCTGGCTGGAAGGCACCAGGCCCCAGGCCCAGCAGGCACCAGGAGAAAGGAG  
 ACCCTCTCTTCCCACCTCCCGTGGTGGCCCAGGTTCCCTCAGCAGCGCTTCCCCTCACTGGCC  
 CATTGCAGCCCAAATCTCCGAAGCCAGGCACCCATGGGGGCCACGGGGGCATGGGGGAGTGGGGA  
 GGAGTCCCTCGGTTGACCCTCATCTCCCTCCCAAACCTGCCACTTGATTCTGGCTCCCTGGGCCA  
 ATTGCCCCCAATTCTGCCCCCGCCCCCATCATCCTCTATCTCTTCCCTTAGTGTCCCCTAT  
 CTCACTCAAGCTCACCCCATTTCTGCCTGGCTGTCCCCTCTCCATCCCCAAATCATCATTC  
 AACTCTCTGTTCCCCAGCTCCGGACAGCCCCTGACTCCATGCCTTCTCCGACTCATCCGCT  
 GTCCTTGTCCCAGGGGTCCCCCTCCCTCCTAACACACACACACCGGCTCAGGGAGGGAGAGGA  
 AATGGTGCACCAGGAGAGAGAAAAGGCAAAGGTCATAGGCAGTCCGGTGGGGCGGGGAGGAAGG  
 AAAGTGAAAGGTGACAGGAGAGCTGGGAGCTGTCCCGACATGTCTGGTTTGCCCCTCCCCAG  
 GGGGGCCTGTTCTCCCGACTCCCCCCAGGCCCCCTTAGACGCTTTTCCAGGGCTCTGCAGAAGG  
 GCACCTGAAGATGGTGGGGGCCGGGGTCAGCGGGCGAGTGAGGCTGGAGACCTCCCCCGGATCC  
 CCCATGCTGGAACAGCGGGGACAGGGGCCTCCTCAAGTTCACTTCTCCTGGGTCCCCTGTTGCT  
 CCCAGCATCCCAAGGCAGTGCTGAGGCCCGGGGTGGCTGCGGGAGGGGGCCACACCCCTATA  
 TCTACCTAGCGCAGACCACACGCTTCCAGACACCAGCAGATGGAGGCGGCACCTGCTCCCGTC  
 CCAGGCCGGAGTTTGCAAGCTGCTCGCCGCCCGCGCCCCCTCCCTGGGAGCAGCCCGGGACCGCG  
 GTTGAAAGGAGAAAGCGGAAAGAAAGAAAAGAAAAGAGAGAGGGGAGAGTGAATCTGGG  
 AGAAAGCGCAGAGGGAAGAGCAGCCAGCGAGTGTCCGGAGCGAGGAGGAGGAGGAGGAAGGA  
 GAGGGGGAAGAAGAGGAGGAGGAGGAAGGCTCGGCGCCCCCTCCCTCGCCGCCAACCTGCCGCG  
 GGGCGTGCGGTGTGTTGGGACCATGTGCCCGCGCTCGCTCCGGGCCGCCACCCAGCGCCTCCGGT  
 GGCTGCGCGGGCGCCCCAAGTGTTCGTGTGTCTGCGGCGGGTGGGCGTCCGGCTCGCGCTGCCA  
 AGCGCCCCAAGTTGCCCGCGCGCCCCGCAGCGGGGACGCGAAGCCGGCGCGGGGCGGGTGTATT  
 TACCTGCCGCCAAGACCTTCATTATGG