



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 639**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08002520 .8**

96 Fecha de presentación : **18.11.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1925667**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.05.2008**

54

Título: **Proteína específica de células pancreáticas beta de los islotes de Langerhans y sus aplicaciones.**

30

Prioridad: **18.11.2002 FR 02 14374**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.06.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.06.2011**

73

Titular/es: **Commissariat a l'Énergie Atomique et  
Aux Énergies Alternatives  
Bâtiment "Le Ponant D"  
25, rue Leblanc  
75015 Paris, FR  
Université Joseph Fourier**

72

Inventor/es: **Seve, Michel y  
Favier, Alain**

74

Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 361 639 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

Proteína específica de células pancreáticas beta de los islotes de langerhans y sus aplicaciones

- 5 La presente invención se refiere a una proteína llamada ZnT-8, expresada de forma específica en las células pancreáticas beta de los islotes de Langerhans, al polinucleótido que codifica dicha proteína que está implicado en la maduración y la exocitosis de la insulina, así como a sus aplicaciones, en particular la selección y estudio de células beta, así como para la exploración de medicamentos activos para la diabetes y la hiperinsulinemia.
- 10 La diabetes es una de las enfermedades más frecuentes que afecta al 5% de la población de países industrializados y está en constante aumento en todos los países del mundo (previsión: 300 millones en 2025, de los cuales 2,4 millones en Francia). Entre las diversas formas de la diabetes, la diabetes de tipo I o dependiente de insulina afecta aproximadamente a 500.000 a 1 millón de individuos en los Estados Unidos y 150.000 en Francia, es decir del 0,2 al 0,4% de la población. Los síntomas característicos comprenden un nivel alto de azúcar en la sangre y en la orina, una diuresis importante, hambre y sed intensos así como pérdida de peso.
- 15 La diabetes de tipo II no dependiente de insulina (DNID), descrita también con el nombre de diabetes "grasa" o diabetes de la madurez, a menudo aparece alrededor de la cincuentena. Se trata mediante régimen, toma de medicamentos por vía oral e insulina, después de algunos años de evolución. Hoy en día, 2 millones de franceses se tratan con medicamentos antidiabéticos y/o insulina.
- 20 Aunque la diabetes se puede controlar mediante inyecciones de insulina y aportes controlados de glúcidos, las complicaciones asociadas a esta patología necesitan actualmente nuevos procedimientos para su prevención, tratamiento y diagnóstico.
- El páncreas comprende dos estructuras distintas tanto morfológica como fisiológicamente:
- el páncreas exocrino que produce las enzimas que intervienen en la digestión (amilasa, lipasa, etc.) y el bicarbonato sódico;
  - el páncreas endocrino que produce las hormonas que intervienen en el control de la glucosa en la sangre (insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático).
- 30 Las células del páncreas endocrino están organizadas en microórganos dispersos en el páncreas en forma de islotes (islotes de Langerhans o islotes pancreáticos). Cada islote pancreático está compuesto de 4 tipos celulares: las células alfa, beta, delta y las células PP. Las células alfa están situadas en la periferia del islote y segregan el glucagón. Las células beta se encuentran en el centro del islote y son las únicas células que pueden secretar insulina en respuesta a la glucosa. Las células delta están en la periferia y segregan la somatostatina. La función de las células PP es más controvertida (síntesis del polipéptido pancreático).
- 35 La ausencia de modelo celular de estudio de la célula beta, así como la ausencia de un medio fiable y eficaz de selección celular adaptado a este tipo de células, frena el estudio de su funcionamiento y por lo tanto la puesta a punto de nuevos procedimientos de tratamiento de la diabetes de tipo I y II.
- Entre los tratamientos de la diabetes, además de la administración regular de insulina, una de las vías del control fisiológico de la glucemia y de la normalización de la glucemia en los diabéticos, es el paso por la restauración de una secreción de insulina *in vivo* a partir de células. Desde este punto de vista, se han propuesto varias soluciones:
- la obtención de células productoras de insulina en animales para realizar un xenotransplante;
  - la diferenciación *in vitro* de células secretoras de insulina a partir de células madre aisladas, con el objetivo de reimplantarlas [1], con el fin de salvar los problemas de inmunidad y la necesidad de un tratamiento inmunosupresor del paciente. Pero la producción de cantidades importantes de células con bajo coste, productoras de insulina por diferenciación de células madre, necesita nuevas herramientas biomoleculares, particularmente útiles para la fenotipificación y la purificación de las células diferenciadas;
  - el trasplante de islotes pancreáticos; recientemente muchos trabajos han tenido por objeto la preparación de islotes o de células beta pancreáticas con fines terapéuticos. La primera etapa del trasplante es extraer el páncreas del donante en estado de muerte cerebral. El aislamiento de los islotes empieza por una digestión enzimática del páncreas mediante una solución de colagenasa. No todos los trasplantes requieren una purificación de los islotes digeridos. No obstante, hoy en día la mayoría de los investigadores están de acuerdo en que la purificación de los islotes es necesaria para un alotransplante [2]. Después los islotes se transplantan, a razón de una masa suficiente (mínimo 3000 IEQ/kg) por inyección intraportal (IEQ, por sus siglas en inglés Islet Equivalent, equivalente de islote).
- 55 No obstante, el aislamiento de islotes o de células beta pancreáticas necesita medios de selección y de identificación de células beta, específicos y fiables.
- Trabajos previos han intentado poner a punto procedimientos de marcaje de células beta. Se pueden citar:
- el marcaje por GFP (proteína verde fluorescente) que permite un marcaje fluorescente de la célula. El principal inconveniente de esta técnica es la necesidad de introducir un gen exógeno o transgen en la célula, que necesita además el uso de un vector vírico (adenovirus) [1];
  - la técnica basada en la autofluorescencia importante de las células beta [2]. Pero esta técnica carece de especificidad con respecto al tipo celular;
  - la incubación de las células con un fluorocromo específico del cinc: el Newport Green [3] o la ditizona [4].
- 60 Esta técnica se basa en el contenido importante de cinc de la célula beta. El cinc es un constituyente importante de los gránulos de secreción de insulina, y además, tiene una función en el control de esta secreción [5]. Pero estas
- 65

técnicas tienen numerosos inconvenientes: el uso de un producto químico tiene riesgo de toxicidad respecto a la célula beta y carece de especificidad con respecto al tipo celular. Además, la ditizona plantea un problema de fotodegradación rápida [6]:

- la manifestación por reconocimiento indirecto por un clon de células T (documento WO 91/17186) de un antígeno expresado por las células beta. Los trabajos iniciales sobre este antígeno no aportaron resultados en cuanto a caracterización de la secuencia peptídica, ni en cuanto a selectividad de la célula beta con respecto a los otros tipos celulares del islote, ni tampoco del páncreas y el organismo. Trabajos más recientes de los mismos autores muestran una distribución mucho más grande de este antígeno, que de hecho no es específico de la célula beta [7];

- la detección del transportador de glucosa GLUT-2 [15]; aunque este transportador no es específico de las células beta.

Por lo tanto, existe una necesidad de un marcador específico y fiable de la célula beta de los islotes pancreáticos de Langerhans.

Uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar dicho marcador.

El islote de Langerhans acumula grandes cantidades de cinc y por lo tanto necesita un transportador muy eficaz y muy especializado para acumular este cinc en las vesículas de secreción [8]. La insulina, producida y almacenada en la célula beta pancreática, se libera en el medio extracelular por exocitosis en respuesta a estímulos externos, como un aumento de la concentración de glucosa. Este aumento de glucosa provoca una modificación de la relación ATP/ADP, el cierre de los canales de potasio y la apertura de los canales de calcio, que provoca la exocitosis [9].

Se sabe que en presencia de cinc, la insulina puede formar tetrámeros y hexámeros que fijan el cinc con una relación de insulina : cinc de 4:1 a 6:2, respectivamente. La insulina se almacena en los gránulos de secreción en forma de un sólido compuesto de hexámeros unidos a 2 átomos de cinc por hexámero. Las vesículas contienen cinc en un exceso de 1 a 1,5 veces la cantidad necesaria para formar los hexámeros de insulina-cinc. Durante la exocitosis de la insulina, las vesículas ricas en insulina se fusionan con la membrana plasmática de la célula beta y liberan la insulina, pero también cinc, a la circulación. El cinc liberado actúa en un bucle de retrocontrol negativo sobre los canales de potasio, provocando su activación y la detención de la exocitosis.

En las células de mamíferos, se han clonado y caracterizado 7 proteínas homólogas que tienen una función transportadora de cinc, denominadas ZnT1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7. El análisis de la estructura primaria de estas proteínas ha permitido definir un motivo estructural común compuesto de 6 dominios transmembrana y un bucle intracelular rico en histidina. ZnT-1 es un transportador ubicuo, localizado en la membrana plasmática que asegura el flujo de salida del cinc fuera de la célula [11]. ZnT-2 permite a la célula tolerar un exceso de cinc en el medio de cultivo, otorgando así una resistencia al cinc por una localización del mismo en las vesículas intracitoplasmáticas ácidas, asegurando así una acumulación del cinc en la célula muy superior a la normal [12]. ZnT-3 y ZnT-4 clonadas en el ser humano, tienen funciones similares a ZnT-2. ZnT-3 es específica de determinados tejidos y se expresa fuertemente en el cerebro, en las membranas de las vesículas sinápticas ricas en cinc, en las fibras musgosas del hipocampo y en los testículos. ZnT-4 se expresa de forma ubicua, pero se encuentran niveles más elevados en el cerebro y en las células epiteliales. Este transportador es esencial en el epitelio de mamíferos donde participa en el control del contenido de cinc de la leche materna. ZnT-5 y ZnT-6 también son transportadoras ubicuas localizadas en el aparato de Golgi. ZnT-7 es una transportadora ubicua localizada específicamente en el retículo endoplásmico de las células.

En la solicitud internacional WO 02/24733, también se ha descrito un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador de cinc denominado NOV2. Dicho polipéptido se expresa a nivel, no sólo del páncreas, sino también de la médula ósea, el cartílago, la placenta y el riñón. Por consiguiente, debido a su expresión en diversos tejidos, este polipéptido no puede usarse como marcador específico de las células beta pancreáticas.

Trabajos previos mencionan un intento de buscar los genes implicados en el metabolismo del cinc en la célula beta pancreática. Estos trabajos no han conducido a la prueba de una proteína o transportador específicos [10].

Los autores de la invención han aislado un polinucleótido de 1110 pares de bases (ID SEC N°: 1) que representa el ADNc que corresponde a un ARNm expresado de forma específica en el islote de Langerhans, y más particularmente en la célula secretora de insulina o célula beta.

El polinucleótido de la invención codifica una proteína denominada ZnT-8 (ID SEC N°: 2), proteína de 369 aminoácidos correspondiente a una masa molecular calculada de 40,8 kDa, que presenta una estructura primaria homóloga a la de las proteínas de la familia ZnT. El gen que codifica dicha proteína se denomina ZnT-8.

La utilización de un polipéptido que comprende la secuencia SEC ID N°: 2 para la detección, en su sujeto, de anticuerpos dirigidos contra ese polipéptido, en el ámbito de un procedimiento de diagnóstico del cáncer de páncreas se describe en la solicitud internacional WO 01/94409. Sin embargo, dicho polipéptido no se describe como específico de la célula beta de los islotes de Langerhans

El estudio del potencial transmembrana de la proteína ZnT-8 completa muestra que tiene 6 dominios transmembrana (aminoácidos 74-95, 107-126, 141-163, 177-196, 216-240, 246-267), situándose los extremos N- y C-terminales en el citoplasma. Este estudio también muestra que la estructura secundaria de esta proteína presenta 3 bucles de aminoácidos extracelulares (aminoácidos 96-106, 164-176, 241-245).

Además, la localización de la proteína ZnT-8 en las vesículas de secreción de la insulina y sobre la membrana plasmática indican que está implicada en la acumulación de cinc en las vesículas que contienen insulina y por lo tanto, tiene una función en la maduración y en la exocitosis de la insulina en las células beta de los islotes

pancreáticos de Langerhans.

La proteína ZnT-8 y el polinucleótido correspondiente constituyen, por primera vez, un marcador específico y fiable de la célula beta de los islotes pancreáticos de Langerhans; los usos de este marcador son principalmente los siguientes:

- selección celular: el marcador permite considerar una selección y localización selectiva de las células beta, sin modificación química o biológica de dichas células, en particular con ayuda de anticuerpos dirigidos contra dicha proteína.

- modelo de estudio *in vitro*: el marcador puede usarse *in vitro* para estudiar: (1) la sobreexpresión del transportador (ZnT-8) en líneas de células modelo (por ejemplo, insulinoma de rata INS-1) y el impacto en la secreción de insulina en respuesta a una estimulación por glucosa, (ii) la sensibilidad de las células a la muerte celular (apoptosis) inducida por condiciones de estrés oxidante o la concentración débil o fuerte de cinc, y (iii) las etapas de diferenciación de células madre en células secretoras de insulina en respuesta a diferentes estimulaciones exógenas (factores de crecimiento, extractos pancreáticos).

- exploración de medicamentos: el marcador también representa una diana farmacológica útil para la exploración de sustancias que pueden modular la expresión del gen *ZnT-8* y/o la actividad de la proteína ZnT-8, con posible uso para el tratamiento de la diabetes y la hiperinsulinemia.

- diagnóstico de diabetes: el polinucleótido también puede aplicarse ventajosamente en el diagnóstico precoz de la diabetes en familias con riesgo, en particular en cuanto a que permite detectar mutaciones observables en el gen *ZnT-8* y también disminuir o incluso suprimir los exámenes aplicados habitualmente.

De esta manera, la presente invención tiene por objeto el uso de un producto seleccionado entre: (i) una proteína que comprende o consiste en la proteína ZnT-8 de secuencia SEC ID N°:2, (ii) un fragmento de al menos 15 aminoácidos consecutivos de ZnT8, y (iii) y una microplaca de proteína realizada con una proteína como se define en (i) o un fragmento como se define en (ii), para detectar la presencia de anticuerpos dirigidos contra las células beta de los islotes de Langerhans, en el suero de un individuo.

De acuerdo con un modo de realización ventajoso de utilización de acuerdo con la invención, dicho fragmento como se define en (ii) presenta una secuencia seleccionada entre las secuencias SEC ID N°:7; SEC ID N°: 8, SEC ID N°:9 y SEC ID N° 10.

Los autores de la invención describen el uso como marcador específico de células beta de los islotes pancreáticos de Langerhans, al menos un polinucleótido aislado de la proteína correspondiente, seleccionado de:

- los polinucleótidos que comprenden o que presentan una de las siguientes secuencias: (a) la secuencia ID SEC N° 1, (b) un fragmento de la secuencia ID SEC N° 1, de al menos 15 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos, aún más preferiblemente de 25 a 30 nucleótidos, (c) una secuencia que presenta un porcentaje de identidad de al menos el 80% después del alineamiento óptimo con una de las secuencias definidas en (a) o en (b), y (d) una secuencia complementaria, con sentido o antisentido de una de las secuencias definidas en (a), (b) o (c),

- las proteínas codificadas por los polinucleótidos definidos anteriormente en (a), (b), (c) o (d), que comprenden o presentan una de las siguientes secuencias: (e) la secuencia ID SEC N° 2, (f) un fragmento de la secuencia ID SEC N° 2 de al menos 15 aminoácidos consecutivos, (g) una secuencia que presenta un porcentaje de identidad de al menos el 60% después del alineamiento óptimo con una de las secuencias definidas en (e) o en (f) o al menos una similitud del 65%, preferiblemente el 80% de identidad o al menos el 90% de similitud, o de manera aún más preferida el 90% de identidad o al menos el 95% de similitud.

El polinucleótido definido anteriormente puede aislarse a partir de células de Langerhans o a partir de bancos de ADN celular, en particular de bancos de ADN de células pancreáticas, muy particularmente a partir de un banco de ADN de células pancreáticas humanas. Preferiblemente, las células usadas son células de los islotes de Langerhans.

El polinucleótido definido anteriormente también puede obtenerse por una reacción de polimerización en cadena (PCR) realizada en el ADN total de las células de Langerhans, por RT-PCR realizada en los ARN totales de las células beta de los islotes pancreáticos de Langerhans o por síntesis química.

Por polinucleótido se entiende un encadenamiento exacto de nucleótidos, modificados o no, que comprende o no nucleótidos no naturales. Así pues, este término incluye cualquier secuencia que codifique una proteína ZnT-8 o un fragmento de dicha proteína (ADN genómico, ARNm, ADNc) aunque también los oligonucleótidos, con sentido o antisentido, así como los ARN interferentes pequeños (ARNip) correspondientes.

Por "ácidos nucleicos o proteínas que presentan un porcentaje de identidad después de alineamiento óptimo con una secuencia de referencia" se entiende que se indican los ácidos nucleicos o las proteínas que presentan, en relación con la secuencia de referencia, algunas modificaciones como en particular una deleción, un truncamiento, un alargamiento, una fusión quimérica y/o una sustitución, en particular puntual, y cuya secuencia de nucleótidos presenta al menos el 80% de identidad y la secuencia de aminoácidos presenta al menos el 65% de identidad después del alineamiento óptimo con la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de referencia.

Por "porcentaje de identidad" entre dos secuencias (ácidos nucleicos o proteínas) se entiende que se indica un porcentaje de nucleótidos o de restos de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias que se comparan, obtenido después del mejor alineamiento, siendo este porcentaje puramente estadístico y estando las diferencias entre las dos secuencias repartidas al azar y en toda su longitud.

Por "mejor alineamiento" o "alineamiento óptimo", se entiende que se indica el alineamiento para el cual el porcentaje de identidad determinado como se describe a continuación, es el más alto. Las comparaciones entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se realizan de forma tradicional: comparando estas secuencias después de haberlas alineado de forma óptima, realizándose dicha comparación por segmento o por "ventana de

comparación” para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación se puede realizar, en particular usando uno de los siguientes algoritmos: el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981), el algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970), el procedimiento de investigación de similitud de Pearson y Lipman (1988), los programas informáticos que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, BLASTX, TBLASTX, FASTA y TFASTA en el Paquete informático Wisconsin Genetics (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o en los servidores de internet, en particular los del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), de EMBL (<http://www.embl.org>) y del proyecto Ensembl (<http://www.ensembl.org>)).

Con el fin de obtener el alineamiento óptimo, se usa preferiblemente el programa BLAST, con la matriz BLOSUM 62. También pueden usarse las matrices PAM o PAM250, así como una matriz de identidad para las secuencias de nucleótidos.

Para obtener una “hibridación específica” se usan preferiblemente condiciones de hibridación muy rigurosas, es decir condiciones de temperatura y de fuerza iónica seleccionadas de manera que permitan mantener la hibridación específica y selectiva entre los polinucleótidos complementarios.

A modo de ilustración, condiciones muy rigurosas de la etapa de hibridación con el fin de definir los polinucleótidos descritos anteriormente, son ventajosamente las siguientes: la hibridación ADN-ADN o ADN-ARN se realiza en dos etapas: (1) prehibridación a 42°C durante 3 horas en tampón fosfato (20 mM pH 7,5) que contiene 5 x SSC (1 x SSC corresponde a una solución de NaCl 0,15 M + citrato sódico 0, 015 M), formamida al 50%, dodecilsulfato sódico (SDS) al 7%, 10 x Denhardt's, sulfato de dextrano al 5% y ADN de esperma de salmón al 1%; (2) hibridación propiamente dicha durante 20 horas a una temperatura que depende del tamaño de la sonda (es decir: 42°C, para una sonda de un tamaño superior a 100 nucleótidos) seguido de 2 lavados de 20 minutos a 20°C en 2 x SSC + SDS al 2%, 1 lavado de 20 minutos a 20°C en 0,1 x SSC + SDS al 0,1%. El último lavado se realiza en 0,1 x SSC + SDS al 0,1% durante 30 minutos a 60°C, para una sonda de un tamaño superior a 100 nucleótidos. El experto en la materia puede adaptar las condiciones de hibridaciones muy rigurosas, descritas anteriormente para una sonda de tamaño definido, para sondas de tamaño más grande o más pequeño.

En este documento, por “técnicas o procedimientos adecuados” se entiende que se refiere a técnicas o procedimientos bien conocidos y habitualmente usados por el experto en la materia y que se exponen en numerosos trabajos, como en particular el titulado *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Sambrook J, Russell DW. (2000) Cold Spring Harbor Laboratory Press) [13].

El polinucleótido definido en c) presenta un porcentaje de identidad de al menos el 80% después del alineamiento óptimo con una secuencia como la definida en a) o b), preferiblemente el 90%, de manera más preferible el 95%, de manera aún más preferible el 98%. El polinucleótido definido en c) incluye los polinucleótidos variantes de la secuencia SEC ID N° 1, es decir el conjunto de polinucleótidos correspondientes a las variantes alélicas, es decir a variaciones individuales de la secuencia SEC ID N° 1. Estas secuencias variantes naturales corresponden a polimorfismos presentes en los mamíferos, en particular en el ser humano, y en concreto a polimorfismos que pueden conducir a la aparición de una patología, como por ejemplo la muerte celular de los islotes de Langerhans y una diabetes.

Del mismo modo, por polinucleótido variante se entiende que se indica cualquier ARN o ADNc resultante de una mutación y/o de una variación de un sitio de ajuste y empalme de la secuencia genómica cuyo ARNm tiene como ADN complementario el polinucleótido de la secuencia SEC ID N° 1.

La similitud de una proteína en relación a una proteína de referencia se aprecia en función del porcentaje de restos de aminoácidos que son idénticos o que difieren por las sustituciones conservativas, cuando se alinean las dos secuencias, para obtener la máxima correspondencia entre ellas. Por sustitución conservativa se entiende la sustitución de un aminoácido por otro que presenta propiedades químicas similares (tamaño, carga o polaridad), que en general no modifica las propiedades funcionales de la proteína.

Una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos X% de similitud con una secuencia de referencia, se define como una proteína cuya secuencia puede incluir hasta 100-X modificaciones no conservativas por 100 aminoácidos de la secuencia de referencia. La expresión modificaciones no conservativas incluye deleciones, sustituciones no conservativas o inserciones consecutivas o dispersas de aminoácidos en la secuencia de referencia.

En las proteínas definidas en (g) se incluyen las proteínas variantes de la secuencia SEC ID N° 2, es decir las proteínas variantes codificadas por los polinucleótidos variantes como se han definido previamente, en particular las proteínas cuya secuencia de aminoácidos presenta al menos una mutación que corresponde en concreto a un truncamiento, una deleción, una sustitución y/o una adición de al menos un resto aminoacídico en relación a la secuencia SEC ID N° 2.

De manera preferida, las proteínas variantes presentan una mutación asociada a la diabetes o a la hiperinsulinemia.

De acuerdo con un modo de realización ventajoso del uso como se ha definido anteriormente, dicho polinucleótido aislado como se define en (c), es un polinucleótido variante de la secuencia SEC ID N° 1, que comprende una mutación que conduce a una modificación de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la secuencia ID SEC N° 1.

De acuerdo con otro modo de realización ventajoso del uso como se ha definido anteriormente, dichos polinucleótidos aislados como se definen en (b) o en (d) se seleccionan entre los pares de cebadores de la SEC ID N° 3 y la SEC ID N° 4 y el par de cebadores de la SEC N° 5 y la SEC ID N° 6.

De acuerdo con otro modo de realización ventajoso del uso como se ha definido anteriormente, dicho

polinucleótido aislado puede obtenerse por amplificación usando un par de cebadores como se ha definido anteriormente.

De acuerdo con otro modo de realización ventajoso del uso como se ha definido anteriormente, dicho polinucleótido como se define en (d) es un ARN interferente pequeño (ARNip) que por interacción con los ARNm correspondientes a dicho polinucleótido, conducirá a su degradación.

De acuerdo con otro modo de realización ventajoso del uso como se ha definido anteriormente,, dicha proteína como se define en (g) es una variante de la secuencia SEC ID N° 2, que presenta una mutación asociada a la diabetes o a la hiperinsulinemia.

Los autores de la presente invención también describen un polinucleótido como se ha definido anteriormente, con excepción de:

- los fragmentos de al menos 15 nucleótidos consecutivos incluidos en las secuencias que tienen los números de acceso en la base de datos NCBI n° AX526723, n° AX526725 y n° AX526727.

- los EST que tienen los números de acceso en la base de datos GenBank BM565129, BM310003, BM875526, BG655918, BQ417284, BQ267316, BU072134, BQ267526, BQ270198, BU581447, BU070173, BQ631692 y BU949895, así como las secuencias que tienen los números de acceso en la base de datos NCBI AX526723, AX526725 y AX526727.

Los fragmentos, como los definidos anteriormente, pueden usarse en concreto como sondas o como cebadores para detectar/amplificar los polinucleótidos (ARN o ADN genómico) correspondientes al polinucleótido, como se ha definido anteriormente, en otros organismos.

Preferiblemente, los pares de cebadores que pueden usarse son los que corresponden a los pares definidos por las secuencias SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4 y por las secuencias SEC ID N° 5 y SEC ID N° 6.

Los autores de la invención también describen los polinucleótidos que pueden obtenerse por amplificación usando de cebadores como los definidos anteriormente.

De acuerdo con un modo de realización ventajoso de dicho polinucleótido,, se trata de un ARN interferente pequeño que corresponde al polinucleótido definido anteriormente, de un tamaño inferior a 30 nucleótidos, preferiblemente de un tamaño comprendido entre 20 y 23 nucleótidos, que por interacción con los ARNm correspondientes a dicho polinucleótido, conducirá a su degradación. Estos ARNip pueden obtenerse por cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia, por ejemplo, por síntesis química o por expresión a partir de un vector.

Los autores de la invención describen oligonucleótidos con sentido correspondientes a los polinucleótidos, como se ha definido anteriormente, que por interacción con proteínas implicadas en la regulación de la expresión de dicho polinucleótido, como se ha definido anteriormente, inducirán una inhibición o una activación de esta expresión.

Las sondas y cebadores, como se ha definido anteriormente, pueden marcarse de forma directa o indirecta con un compuesto radiactivo o no radiactivo por procedimientos bien conocidos por el experto en la materia, con el fin de obtener una señal detectable y/o cuantificable.

El marcaje de cebadores o de sondas, como se ha definido anteriormente, se realiza con elementos radiactivos o con moléculas no radiactivas. Entre los isótopos radiactivos usados, pueden citarse <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>3</sup>H o <sup>125</sup>I. Las entidades no radiactivas se seleccionan entre los ligandos tales como la biotina, avidina, estreptavidina, digoxigenina, haptenos, colorantes, agentes luminiscentes tales como agentes radioluminiscentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes, fluorescentes y fosforescentes.

Los polinucleótidos, como se ha definido anteriormente, pueden usarse, por lo tanto, como cebador y/o sonda en procedimientos que aplican concretamente la técnica de la PCR (amplificación en cadena de la polimerasa) (documento U. S. N° 4.683.202). Ventajosamente, como alternativa a la PCR, pueden usarse otras técnicas de amplificación del ácido nucleico diana. Actualmente existen numerosos procedimientos que permiten esta amplificación, como por ejemplo, la técnica de SDA (*Strand Displacement Amplification*) o técnica de amplificación por desplazamiento de cadena, la técnica TAS (*Transcription-based Amplification System*, sistema de amplificación basado en transcripción), la técnica 3SR (*Self-Sustained Sequence Replication*, Replicación autosostenida de secuencia), la técnica NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*, amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico), la técnica TMA (*Transcription Mediated Amplification*, amplificación mediada por transcripción), la técnica LCR (*Ligase Chain Reaction*, reacción en cadena por la ligasa), la técnica de RCR (*Repair Chain Reaction*, reacción de reparación en cadena), la técnica CPR (*Cycling Probe Reaction*, reacción de ciclación con sonda), la técnica de la amplificación por Q-beta-replicasa. También puede citarse la PCR-SSCP que permite detectar mutaciones puntuales.

El experto en la materia conoce a la perfección estas técnicas.

Como sondas o como cebadores, los diferentes polinucleótidos, como se ha definido anteriormente, permiten determinar el perfil de transcripción del gen correspondiente o una modificación eventual de este perfil en una muestra biológica, poner de manifiesto el gen correspondiente, las variantes alélicas de ese gen o una modificación eventual funcional de ese gen (cambio sustancial de la actividad de la proteína codificada por dicho gen) que resulta de una mutación (inserción, delección o sustitución) de uno o varios nucleótidos a nivel de al menos un exón de dicho gen. Dichas mutaciones incluyen en particular delecciones, inserciones o sustituciones no conservativas a nivel de los codones que corresponden a restos de aminoácidos situados en un dominio esencial para la actividad biológica de la proteína.

De este modo, los autores de la invención describen un procedimiento de determinación del perfil de transcripción del gen correspondiente al polinucleótido, como se describe anteriormente, o de una modificación de dicho perfil, en una muestra biológica, que comprende una primera etapa de obtención de ARN totales a partir de la

muestra biológica, una segunda etapa de poner en contacto dichos ARN con una sonda marcada constituida por un polinucleótido, como se ha definido anteriormente, en condiciones de hibridación apropiadas entre los ARN y la sonda y una tercera etapa de revelación por cualquier medio apropiado de los híbridos formados.

5 Según un modo de realización de dicho procedimientos, la segunda etapa puede ser una etapa de retrotranscripción y/o de amplificación de los transcritos realizada usando un par de cebadores, como se describe anteriormente, y la tercera etapa, una etapa de revelación por cualquier medio apropiado de los ácidos nucleicos amplificados formados.

10 Adicionalmente, dicho procedimiento de determinación del perfil de transcripción del gen puede comprender una etapa de evaluación de la tasa de transcripción del gen en comparación con una muestra control previamente seleccionada y opcionalmente el estudio de su correlación con un fenotipo detectable, como por ejemplo la tasa de proinsulina convertida en insulina madura, el contenido de insulina en las células, la tasa de insulina secretada en respuesta a una estimulación por la glucosa, la concentración intracelular o intravesicular de cinc o también la cantidad de proteína (producto génico) expresada en la superficie de la célula. Dicha muestra control puede constituirse, por ejemplo, por una muestra biológica que presente una transcripción normal o modificada del gen correspondiente al polinucleótido, como se ha definido anteriormente, al que se aplica dicho procedimiento de determinación del perfil de transcripción del gen en las mismas condiciones.

15 Los autores de la invención también describen un procedimiento para poner de manifiesto el gen correspondiente al polinucleótido de la invención, como se ha definido anteriormente, o las variantes alélicas de dicho gen o una modificación funcional de ese gen, en una muestra biológica, que comprende una primera etapa de obtención por cualquier medio apropiado del ADN a partir de la muestra biológica, una segunda etapa de poner en contacto dichos ADN con una sonda marcada constituida por un polinucleótido, como se ha definido anteriormente, en condiciones de hibridación específica apropiada entre los ADN y la sonda, y una tercera etapa de revelación por cualquier medio apropiado de los híbridos formados.

20 De acuerdo con un modo de realización ventajoso de dicho procedimiento, la segunda etapa puede ser una etapa de amplificación realizada usando un par de cebadores, como se ha definido anteriormente, y la tercera etapa, una etapa de revelación, por cualquier medio apropiado, de los ácidos nucleicos amplificados formados. El procedimiento puede comprender opcionalmente una cuarta etapa de aislamiento y secuenciación de los ácidos nucleicos manifestados.

25 Este último procedimiento puede permitir también aislar un alelo del gen correspondiente al polinucleótido, asociado a un fenotipo detectable, como por ejemplo, una variación de la glucemia postprandial, la presencia o no de una secreción de insulina, la tasa de glucosa circulante o de insulina secretada en respuesta a una estimulación por la glucosa, y de manera general a una patología de tipo diabetes de tipo I o II, o también a una anomalía del metabolismo de cinc. El cinc excretado durante la liberación de la insulina actúa en los canales de potasio, responsables por medio de los canales de calcio, de esta exocitosis. Por lo tanto, existe un bucle de retrocontrol [14]. El polipéptido de la invención está implicado en la acumulación del cinc en las vesículas que contienen insulina, y se encuentra también durante la exocitosis en la membrana plasmática. Por lo tanto, mutantes de la proteína podrían modificar la cantidad de cinc presente en las vesículas o la concentración pericelular de cinc, y por lo tanto modificar el estado de apertura del canal de potasio, dando lugar, después del efecto de la mutación, a una disminución o a un aumento de la excreción de insulina (diabetes de tipo I o hiperinsulinemia). En este procedimiento particular, la muestra biológica será una muestra procedente de un individuo que exprese dicho fenotipo detectable.

30 Estos procedimientos, en particular los basados en la búsqueda de mutaciones en el gen, pueden permitir poner de manifiesto de forma preventiva una predisposición a la diabetes, o el diagnóstico de la diabetes o de cualquier enfermedad asociada a la diabetes, o la adaptación en términos de molécula o de posología del o de los tratamientos antidiabéticos.

35 Los autores de la invención también describen un kit de reactivos para realizar los procedimientos descritos previamente, que comprende:

- 40 a) al menos una sonda o un par de cebadores, como se describe anteriormente;
- 45 b) los reactivos necesarios para realizar una reacción de hibridación entre dicha sonda y/o dichos cebadores y el ácido nucleico de la muestra biológica que se va a ensayar;
- 50 c) los reactivos necesarios para realizar una reacción de amplificación;
- d) los reactivos necesarios para la detección y/o dosificación del híbrido formado entre dicha sonda y el ácido nucleico de la muestra biológica o de los ácidos nucleicos amplificados formados.

Dicho kit también puede contener controles positivos o negativos con el fin de asegurar la calidad de los resultados obtenidos. También puede contener los reactivos necesarios para preparar ácidos nucleicos a partir de la muestra biológica.

55 Los autores de la invención describen una microplaca de ADN que comprende al menos un polinucleótido, como se describe anteriormente.

Los autores de la invención describen el uso de un polinucleótido, como se ha definido anteriormente, para preparar una microplaca de ADN. En función del soporte seleccionado, el experto en la materia, sabe seleccionar la técnica de realización apropiada para realizar dicha microplaca, tal como por ejemplo por depósito de oligonucleótidos sobre soporte de vidrio o de nailon, por injerto químico o electroquímico de oligonucleótidos.

Dicho polinucleótido puede usarse *in vitro*, como medio de estudio:

- 60 a) de la sobreexpresión del transportador (ZnT-8) en líneas de células modelo (por ejemplo insulinoma de rata INS-1), y del impacto en la secreción de insulina como respuesta a una estimulación por glucosa;
- 65 b) de la sensibilidad de las células a la muerte celular (apoptosis) inducida por condiciones de estrés

oxidante o de concentración alta o baja de cinc;

c) de las etapas de diferenciación de células madre en células secretoras de insulina en respuesta a diferentes estimulaciones exógenas (factores de crecimiento, extractos pancreáticos).

5 Los autores de la invención también describen la proteína codificada por el polinucleótido, como se ha definido anteriormente.

Por "proteína" se entiende que se indica un encadenamiento exacto de aminoácidos, modificados o no, que comprenden o no aminoácidos no naturales.

10 La proteína de acuerdo con la invención se obtiene a partir de una célula beta, por síntesis química, por técnicas de ADN recombinante, en concreto a partir de un vector de expresión que comprende un inserto constituido por el polinucleótido como se ha definido anteriormente.

Los autores de la invención también describen el uso de un polinucleótido, como se ha definido anteriormente, para producir una proteína ZnT-8, como se ha definido anteriormente.

15 Cuando dicha proteína se obtiene por síntesis química, puede obtenerse por una de las numerosas vías de síntesis peptídica conocidas, por ejemplo con las técnicas que aplican fases sólidas o técnicas que usan fases sólidas parciales, por condensación de fragmentos o por una síntesis en solución clásica. En este caso, la secuencia de la proteína puede modificarse con el fin de mejorar su solubilidad, en particular en disolventes acuosos. El experto en la materia, conoce dichas modificaciones, como por ejemplo, la delección de dominios hidrófobos o la sustitución de aminoácidos hidrófobos por aminoácidos hidrófilos.

20 Preferiblemente, una proteína, como se ha definido anteriormente, es una proteína que comprende o presenta la secuencia SEC ID N° 2 (correspondiente a la proteína codificada por el gen *ZnT-8*).

Los autores de la invención también describen un fragmento de la proteína, como se ha definido anteriormente, **caracterizado porque** se selecciona del grupo constituido por las secuencias SEC ID N°: 7, SEC ID N°:8, SEC ID N°: 9 y SEC ID N°:10.

25 Los autores de la invención también describen una microplaca de proteína que comprende una proteína o un fragmento de proteína como se ha definido anteriormente.

Los autores de la invención también describen el uso de una proteína o de un fragmento de proteína, como se ha definido anteriormente, para preparar una microplaca de proteína. Al igual que para las microplacas de ADN, el experto en la materia, en función del soporte elegido, sabe seleccionar la técnica de realización adecuada para preparar dicha microplaca.

30 De acuerdo con la invención, la proteína, el fragmento de proteína o la microplaca de proteína, como se ha definido anteriormente, pueden usarse para detectar la presencia de anticuerpos dirigidos contra las células beta de los islotes de Langerhans, en el suero de un individuo.

35 La invención también se refiere al uso de la proteína o el fragmento de proteína, como se ha definido anteriormente, para mediciones por procedimientos inmunoquímicos e inmunoenzimáticos, así como para la búsqueda de anticuerpos dirigidos contra las células beta de los islotes de Langerhans.

Los autores de la invención también describen un vector de clonación y/o de expresión, en el que se ha insertado el polinucleótido, como se ha definido anteriormente.

40 Dicho vector puede contener los elementos necesarios para la expresión y opcionalmente la secreción de la proteína en una célula huésped.

Dichos vectores comprenden preferiblemente: un promotor, señales de inicio y de terminación de la traducción, así como regiones de regulación de la transcripción apropiadas. Deben poder mantenerse de manera estable en la célula y pueden comprender opcionalmente secuencias que codifican señales particulares que especifican la secreción de la proteína traducida, tales como por ejemplo, un promotor fuerte de naturaleza ubicua o un promotor selectivo de un tipo de célula y/o tejido particular, como por ejemplo el páncreas. Estas diferentes secuencias de control se seleccionan en función del huésped celular usado.

45 El polinucleótido, como se ha definido anteriormente, puede insertarse en vectores de replicación autónoma dentro del huésped seleccionado o de vectores integrantes del huésped seleccionado.

50 Entre los sistemas de replicación autónoma, se usan preferiblemente, en función de la célula huésped, sistemas de tipo plasmídico o viral. Particularmente, los vectores virales pueden ser adenovirus, retrovirus, lentivirus, poxvirus o virus del herpes. El experto en la materia conoce las tecnologías que pueden usarse para cada uno de estos sistemas.

55 Cuando se desea la integración de la secuencia en los cromosomas de la célula huésped, pueden usarse, por ejemplo, sistemas de tipo plasmídico o vial; dichos virus son, por ejemplo, retrovirus o virus asociados a adenovirus (Virus Adeno-Asociados o AAV).

Entre los vectores no virales, se prefieren los polinucleótidos desnudos, tales como ADN o ARN desnudos, los cromosomas artificiales de bacterias (BAC, *bacterial artificial chromosome*), cromosomas artificiales de levaduras (YAC, *yeast artificial chromosome*) para la expresión en la levadura, cromosomas artificiales de ratón (MAC, *mouse artificial chromosome*) para la expresión en células murinas y de manera preferida los cromosomas artificiales del ser humano (HAC *human artificial chromosome*) para la expresión en células humanas.

60 Dichos vectores se preparan de acuerdo con los procedimientos usados habitualmente por el experto en la materia, y los vectores recombinantes resultantes pueden introducirse en el huésped adecuado por procedimientos convencionales, tales como, por ejemplo, lipofección, electroporación, choque térmico, transformación después de permeabilización química de la membrana y fusión celular.

65 Los autores de la invención también describen células huéspedes modificadas, particularmente células eucariotas y procariotas, en las que se ha introducido al menos un polinucleótido, como se ha definido

anteriormente, o al menos un vector, como se ha definido anteriormente.

Entre las células que pueden usarse, pueden citarse las células bacterianas, células de levadura, células animales, en particular células de mamíferos o también células vegetales. También pueden citarse células de insectos en las que pueden usarse procedimientos que aplican, por ejemplo, baculovirus.

Los autores de la invención también describen organismos no humanos transgénicos, tales como animales o vegetales transgénicos, en los que todas las células o parte de estas contienen el polinucleótido o el vector como se ha definido anteriormente, en forma libre o integrada.

Preferiblemente, los organismos no humanos transgénicos son aquellos portadores de células que contienen un polinucleótido, como se ha definido anteriormente, no funcional o portador de una mutación.

Los animales transgénicos son preferiblemente mamíferos, más preferiblemente roedores, en particular ratones, ratas o conejos, y suidos, en particular el cerdo.

Los animales transgénicos pueden obtenerse por cualquier procedimiento clásico conocido por el experto en la materia, como por ejemplo, por recombinación homóloga en células madre embrionarias, transferencia de estas células madre a embriones, selección de quimeras afectadas a nivel de líneas reproductoras y crecimiento de dichas quimeras.

Las células, animales o vegetales transgénicas pueden así expresar o sobreexpresar el gen que codifica la proteína, como se ha definido anteriormente, o su gen homólogo, o expresar dicho gen en el que se ha introducido la mutación.

Los animales transgénicos pueden usarse, por ejemplo, como modelos para el estudio de la etiología de la diabetes.

Los organismos transgénicos pueden usarse para la producción de la proteína, como se ha definido anteriormente.

La proteína, como se ha definido anteriormente, puede purificarse según las técnicas conocidas por el experto en la materia. Así pues, la proteína puede purificarse a partir de lisados y extractos celulares, del sobrenadante del medio de cultivo, por procedimientos usados individualmente o combinados, tales como fraccionamiento, procedimientos de cromatografía, técnicas de inmunoafinidad usando anticuerpos monoclonales o policlonales específicos, etc. Preferiblemente, dicha proteína se purifica según un procedimiento que comprende una primera etapa de separación de las proteínas de membrana por centrifugación, seguido de una segunda etapa de purificación por inmunoafinidad según el procedimiento descrito por T.C. Thomas, M.G. McNamee, (Purification of membrane proteins. Section IX, págs. 499-520, en Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification, Editado por M.P. Deutscher, vol 182, Academic press, New-York, 1990").

Los autores de la invención también describen un procedimiento de preparación de la proteína ZnT-8 recombinante, **caracterizado porque** comprende el cultivo de dichas células modificadas, en concreto las células de mamíferos o células de organismos no humanos transgénicos, como se han definido anteriormente, en condiciones que permitan la expresión de dicha proteína, y la purificación de dicha proteína recombinante.

Los autores de la invención también describen una proteína, **caracterizada porque** puede obtenerse por uno cualquiera de los procedimientos de preparación descritos anteriormente.

La proteína obtenida como se ha indicado anteriormente, puede presentarse también tanto en forma glicosilada como no glicosilada y puede presentar o no la estructura terciaria de la proteína natural.

Los autores de la invención también han podido mostrar, mediante un estudio del potencial transmembrana, que la estructura secundaria de la proteína de la invención presenta 3 bucles de aminoácidos extracelulares (aminoácidos 96-106, 164-176, 241-245) contra los que pueden producirse anticuerpos monoclonales o policlonales.

De esta manera, los autores de la invención también describen anticuerpos mono o policlonales, **caracterizados porque** pueden reconocer específicamente una proteína de acuerdo con la invención.

Preferiblemente, los anticuerpos reconocen específicamente la proteína de la secuencia SEC ID N° 2, sus fragmentos o las variantes de dicha proteína, como se han definido anteriormente.

De manera preferida, dichos anticuerpos reconocen específicamente los bucles extracelulares de la proteína, como se ha definido anteriormente, que corresponden a las SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8 y SEC ID N°: 10 (PEP1, PEP2 y PEP4) y/o un bucle intracelular de la proteína, como se ha definido anteriormente, que corresponde a la SEC ID N°: 9 (PEP3).

Dichos anticuerpos son, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fragmentos Fab o F(ab')<sub>2</sub>. También pueden presentarse en forma de inmunoconjugados o de anticuerpos marcados con el fin de obtener una señal detectable y/o cuantificable.

Dichos anticuerpos pueden obtenerse directamente a partir de suero humano, o a partir del suero de animales inmunizados con las proteínas, como se han definido anteriormente, en concreto las producidas por recombinación genética o por síntesis peptídica.

Los anticuerpos policlonales específicos pueden obtenerse según los modos operativos habituales. Los anticuerpos monoclonales específicos pueden obtenerse según el procedimiento clásico de cultivo de hibridomas.

Los autores de la invención describen una microplaca de proteína que comprende al menos un anticuerpo, como se ha definido anteriormente.

Los autores de la invención también describen el uso de un anticuerpo, como se ha definido anteriormente, para preparar una microplaca de proteína que comprende dicho anticuerpo. El experto en la materia sabe, en función del soporte seleccionado, seleccionar la técnica de preparación adecuada para fabricar dicha microplaca.

Los autores de la invención también describen el uso de anticuerpos o de una microplaca de anticuerpos,

como se ha definido anteriormente, para detectar y/o purificar una proteína, como se ha definido anteriormente, preferiblemente los bucles extracelulares o intracelulares de dicha proteína, de manera preferida las secuencias correspondientes a las SEC ID N°: 7 a SEC ID N°: 10.

5 De manera general, los anticuerpos como los definidos anteriormente pueden usarse ventajosamente en cualquier situación en la que deba observarse la expresión de una proteína, como se ha definido anteriormente, normal o mutada.

10 En particular, los anticuerpos monoclonales pueden usarse para detectar estas proteínas en una muestra biológica. Constituyen, por lo tanto, un medio de análisis inmunocitoquímico o inmunohistoquímico de la expresión de proteínas, como se ha definido anteriormente, en concreto la proteína de secuencia SEC ID N°: 2, o una de sus variantes, en cortes de tejidos específicos. En general, para dichos análisis, los anticuerpos usados se marcan para ser detectables, por ejemplo, con compuestos inmunofluorescentes, por marcaje con oro o en forma de inmunoconjugados enzimáticos.

15 En concreto, pueden permitir poner de manifiesto una expresión anómala de estas proteínas en los tejidos o extracciones biológicas.

Los autores de la invención también describen un procedimiento de detección en una muestra biológica de la proteína ZnT-8, que comprende una primera etapa de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo, como se ha definido anteriormente, y una segunda etapa de poner de manifiesto por cualquier medio apropiado el complejo antígeno-anticuerpo formado.

20 Los autores de la invención también describen un kit que permite realizar el procedimiento descrito anteriormente, que comprende:

a) al menos un anticuerpo monoclonal o policlonal, como se ha definido anteriormente;

b) los reactivos que permiten la detección del complejo antígeno-anticuerpo producido durante la reacción inmunológica.

25 De acuerdo con un modo de realización particular, el kit puede comprender opcionalmente reactivos para la constitución de un medio que permita la reacción inmunológica.

Los anticuerpos también pueden usarse para detectar y/o seleccionar islotes de Langerhans, preferiblemente células beta, a partir de páncreas humano o animal, en concreto páncreas de ratón, rata, conejo y cerdo. Esta selección puede realizarse con un equipo de citometría de flujo (FACS) en relación a las células aisladas. Para los islotes, su marcaje podría mejorar los procedimientos de separación actuales: separación por gradiente de densidad con Ficoll, Euro-Ficoll, Ficoll-diatrizoato sódico o el procedimiento de selección es un gradiente de albúmina sobre un separador de células.

30 Por lo tanto, los autores de la describen un procedimiento de selección de las células beta de islotes de Langerhans, que comprende una primera etapa de poner en contacto las células de una muestra biológica susceptible de contener dichos islotes y/o células con un anticuerpo, como se ha definido anteriormente, una segunda etapa de poner de manifiesto por cualquier medio apropiado las células marcadas por el anticuerpo y una tercera etapa de aislamiento por cualquier medio apropiado de las células marcadas.

Dichos anticuerpos también pueden usarse para seguir el proceso de diferenciación de células madre en células beta de los islotes de Langerhans, en particular humanas o animales, así como para seleccionar las células que expresan la proteína ZnT-8, en particular la proteína de la secuencia SEC ID N°: 2 después de la diferenciación.

35 Por lo tanto, los autores de la invención describen un procedimiento para seguir el proceso de diferenciación de células madre en células del islote pancreático o en células beta, que comprende una etapa de poner en contacto las células de una muestra biológica susceptible de contener dichas células madre que se están diferenciando con un anticuerpo, como se ha definido anteriormente, una segunda etapa de poner de manifiesto por cualquier medio apropiado las células marcadas por el anticuerpo, y una tercera etapa de visualización por cualquier medio apropiado de las células marcadas.

Dicho procedimiento puede comprender además, una etapa de aislamiento complementaria por cualquier medio adecuado, de las células marcadas.

40 El polinucleótido, la célula, el organismo transgénico o la microplaca de ADN, como se ha definido anteriormente, puede usarse para explorar compuestos químicos o bioquímicos que pueden interactuar *in vitro* o *in vivo*, directa o indirectamente, con dicho polinucleótido y/o modular la expresión de dicho polinucleótido.

45 Por lo tanto, los autores de la invención describen un procedimiento de exploración de un compuesto químico o bioquímico que puede interactuar *in vitro* o *in vivo*, directa o indirectamente con dicho polinucleótido, caracterizado porque comprende una primera etapa de poner en contacto, un compuesto químico o bioquímico candidato, con el polinucleótido, célula, organismo no humano transgénico o la microplaca de ADN, como se ha definido anteriormente y una segunda etapa de detección del complejo formado entre el compuesto químico o bioquímico candidato y el polinucleótido, célula, organismo no humano transgénico o la microplaca de ADN.

50 Los autores de la invención también describen un procedimiento de exploración de un compuesto químico o bioquímico que pueda modular *in vitro* o *in vivo*, directa o indirectamente, la expresión del polinucleótido, caracterizado porque comprende una primera etapa de poner en contacto un compuesto químico o bioquímico candidato con el polinucleótido, célula, organismo no humano transgénico o microplaca de ADN como se ha definido anteriormente y una segunda etapa de medición por cualquier medio apropiado de la expresión de dicho polinucleótido.

55 La proteína, célula, organismo transgénico o microplaca de proteína como se ha definido anteriormente pueden usarse para la selección de compuestos químicos o bioquímicos que puedan interactuar *in vitro* o *in vivo*, directa o indirectamente, con dicha proteína, y/o que puedan modular la expresión o la actividad de dicha proteína.

Por lo tanto, los autores de la invención describen un procedimiento de exploración de un compuesto químico o bioquímico que pueda interactuar *in vitro* o *in vivo*, directa o indirectamente, con dicha proteína, caracterizado porque comprende una primera etapa de poner en contacto un compuesto químico o bioquímico candidato con la proteína, célula, organismo no humano transgénico o microplaca de proteína como se ha definido anteriormente, una segunda etapa de detección del complejo formado entre el compuesto químico o bioquímico candidato y la proteína, célula, organismo no humano transgénico o la microplaca de proteína según la invención.

Los autores de la invención también describen un procedimiento de exploración de un compuesto químico o bioquímico que pueda modular *in vitro* o *in vivo*, directa o indirectamente, la expresión y/o la actividad de dicha proteína, **caracterizado porque** comprende una primera etapa de poner en contacto un compuesto químico o bioquímico candidato con la proteína, célula, organismo no humano transgénico o la microplaca de proteína como se ha definido anteriormente, y una segunda etapa de medición por cualquier medio apropiado de la expresión y/o de la actividad de dicha proteína.

Los autores de la invención también describen el polinucleótido, la proteína, los anticuerpos, los vectores o las células transformadas, como se ha definido anteriormente, como medicamentos.

El polinucleótido, la proteína, los anticuerpos, los vectores o las células transformadas, como se ha definido anteriormente, pueden usarse en la preparación de un medicamento destinado para la prevención y/o tratamiento de la diabetes, en particular asociado este a la presencia de al menos una mutación del gen correspondiente a la SEC ID N°: 1, y/o a una expresión anómala de la proteína correspondiente a la SEC ID N°: 2, o destinado a la prevención y/o al tratamiento de hiperinsulinemias cuando se observa una expresión, maduración o secreción anómala del gen de la insulina, o destinado a regular la maduración y la secreción de la insulina en las células beta y/o en células modificadas para la secreción de insulina, o destinado a regular los fenómenos de apoptosis de las células beta.

Una expresión anómala significa una sobreexpresión, una subexpresión o la expresión de una proteína mutada. Una maduración anómala significa una proteólisis ausente o insuficiente de la proinsulina en insulina o una co-cristalización ausente, insuficiente o demasiado importante de la insulina y del cinc en las vesículas de secreción intracelulares.

Los autores de la invención también describen el uso de un polinucleótido, una proteína o un anticuerpo, como se ha definido anteriormente, para determinar una variabilidad alélica, una mutación, una delección, una pérdida de heterocigosis o cualquier anomalía genética del gen que codifica la proteína como se ha definido anteriormente. Se pueden detectar las mutaciones en la secuencia del gen *ZnT-8* directamente por análisis del ácido nucleico y de las secuencias, como se ha definido anteriormente, (ADN genómico, ARN o ADNc), pero también mediante la proteína como se ha definido anteriormente. En particular, el uso de un anticuerpo como se ha definido anteriormente, que reconoce un epítipo que lleva una mutación permite diferenciar una proteína "sana" de una proteína "asociada a una patología".

El experto en la materia también sabe poner en práctica técnicas que permiten el estudio de la modificación de la expresión de un gen, por ejemplo, por análisis del ARNm, en particular por transferencia Northern o por RT-PCR con sondas o cebadores como se ha definido anteriormente, o también por análisis de la proteína expresada, en particular por transferencia Western, usando los anticuerpos como se ha definido anteriormente.

Además de las disposiciones precedentes, la invención comprende también otras disposiciones que surgirán de la siguiente descripción, que se refiere a ejemplos para poner en práctica la invención, así como a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 ilustra el análisis por RT-PCR de la expresión tisular del ARN mensajero que codifica la proteína ZnT-8 (A) por comparación con la expresión del ARN mensajero ubicuo de la actina (B). 1: Cerebro, 2: Corazón, 3: Riñón, 4: Bazo, 5: Hígado, 6: Colon, 7: Pulmón, 8: Intestino delgado, 9: Músculo, 10: Estómago, 11: Testículo, 12: Placenta, 13: Glándulas salivares, 14: Tiroides, 15: Glándulas suprarrenales, 16: Páncreas, 17: Ovarios, 18: Útero, 19: Próstata, 20: Piel, 21: Leucocitos, 22: Médula ósea, 23: Cerebro fetal, 24: Hígado fetal. La expresión de dicho ARNm se detecta solo en el páncreas (carril 16).

La figura 2 ilustra el análisis por RT-PCR de la expresión del ARN mensajero que codifica la proteína ZnT-8, en: una línea de insulinoma de rata (INS-1, carril 1), islotes pancreáticos humanos fetales (carril 2) y adultos (carril 3), por comparación con la línea de células epiteliales (línea Hela). El ARNm se detecta en la línea de insulinoma de rata y los islotes pancreáticos adultos y fetales, mientras que no se detecta ningún transcrito en las células epiteliales (línea Hela). Como control se usa el mensajero de la actina.

La figura 3 ilustra el análisis por microscopía de fluorescencia, de la localización de la proteína de fusión ZnT-8-GFP en células epiteliales (línea Hela) transfectadas. La fluorescencia se localiza en las vesículas intracitoplasmáticas, así como al nivel de la membrana plasmática.

La figura 4 ilustra el análisis por microscopía de fluorescencia, de la localización de la proteína de fusión ZnT-8-GFP en células de insulinoma de rata (línea INS-1) transfectadas. La fluorescencia se localiza en las vesículas de secreción que indican una función de ZnT-8 en la maduración y en la exocitosis de la insulina.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención y no la limitan de ninguna forma.

#### **EJEMPLO 1: Clonación del ADNc que codifica la proteína Znt-8**

El gen que codifica la proteína Znt-8, llamado gen *Znt-8*, se identificó por bioinformática, por búsqueda de los genes homólogos a los de la familia *ZnT*, usando las secuencias del genoma humano disponibles. El análisis de las secuencias genómicas ha permitido localizar y definir la organización intrón/exón del gen *Znt-8*.

El ADN que codifica ZnT-8 se amplificó por RT-PCR a partir de ARNm de islotes de páncreas humano preparados según la técnica de Kenmochi T. y col. (*Pancreas*, 2000, 20, 2, 184-90), usando el par de cebadores

(SEC ID N°: 5: 5'-ACTCTAGAATGGAGTTTCTTGAAGAACGT A y SEC ID N°: 6: 5'-AATCTA GAGTCACAGGGGTCTTCACAGA), definido a partir de la secuencia del gen *Znt-8*.

De manera más precisa, los ARN totales se extrajeron a partir de los islotes, usando el kit "ARN extraction kit" (Roche) según las instrucciones del fabricante. Los ARN así obtenidos se dosificaron por medición de la absorbancia a 250 nm y se conservaron a -80°C.

La amplificación se realizó usando el kit "Titan one tube RT-PCR kit" (Roche) según las instrucciones del fabricante y el par de cebadores SEC ID N°: 5 y SEC ID N° 6. La transcripción inversa se realizó a 52°C durante 30 min y después los ADN sintetizados se amplificaron por 30 ciclos (30 s a 94°C, 30 s a 53°C, 1 min a 72°C) y una elongación final de 5 min a 72°C. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en gel de agarosa (1,5%) en presencia de bromuro de etidio y el producto de amplificación de 1123 pares de bases que comprende la secuencia de ADNc que presenta la secuencia SEC ID N°: 1 se purificó usando el kit Nucleic acid purification kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **EJEMPLO 2: Análisis de la expresión tisular del ARN mensajero que codifica la proteína Znt-8**

La expresión del ARN mensajero que codifica la proteína Znt-8 se analizó por PCR con los ADNc comerciales preparados a partir de diferentes tejidos humanos usando los siguientes cebadores: SEC ID N°: 3: 5'-GAT GCT GCC CAC CTC TTA ATT GAC y SEC ID N°: 4: 5'-TCA TCT TTT CCA TCC TGG TCT TGG. Los cebadores (SEC ID N°: 3 y SEC ID N° 4) se seleccionaron en 2 exones diferentes para evitar la amplificación de una secuencia genómica. Los tejidos ensayados son: 1: Cerebro, 2: Corazón, 3: Riñón, 4: Bazo, 5: Hígado, 6: Colon, 7: Pulmón, 8: Intestino delgado, 9: Músculo, 10: Estómago, 11: Testículo, 12: Placenta, 13: Glándulas salivares, 14: Tiroides, 15: Glándulas suprarrenales, 16: Páncreas, 17: Ovario, 18: Útero, 19: Próstata, 20: Piel, 21: Leucocitos sanguíneos, 22: Médula ósea, 23: Cerebro fetal, 24: Hígado fetal.

De manera más precisa: se mezclaron 2  $\mu$ l de ADNc con los 2 cebadores específicos (1  $\mu$ l final) y una mezcla clásica de PCR (1 unidad de ADN polimerasa Taq, tampón con magnesio 1,5 mM, dNTP 10 mM). La amplificación se realizó mediante 30 ciclos (30 s a 94°C, 30 s a 53°C, 1 min a 72°C) y una etapa final de elongación de 5 min a 72°C. Después, los productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (1,5%) en presencia de bromuro de etidio.

Los resultados ilustrados en la figura 1 muestran que, por comparación con el mensajero de la actina usado como control (figura 1B), el ARNm correspondiente al polinucleótido que codifica la proteína Znt-8 se expresa solamente en las células del páncreas (carril 16 de la figura 1A) pero no en las células de los 23 otros tejidos analizados (carriles 1 a 15 y 17 a 24 de la figura 1A).

### **EJEMPLO 3: Expresión del ARN mensajero correspondiente al polinucleótido que codifica la proteína ZnT-8 en células de páncreas fetal y adulto y en una línea de insulinoma de rata (INS-1)**

El análisis de la expresión del ARN mensajero que codifica la proteína ZnT-8 se realizó por RT-PCR a partir de ARN de diferentes tejidos humanos: islotes pancreáticos humanos adultos y fetales, línea de insulinoma de rata (INS-1; Asfari M. y col., *Endocrinology*, 1992, 130, 1, 167-78), por comparación con una línea de células epiteliales humanas (Hela), usada como control. Se lavaron  $10^6$  células dos veces con tampón de fosfato (PBS) y después se centrifugaron 3 min a 2000 g. Los ARN totales se extrajeron como se ha descrito en el ejemplo 1 y la concentración de ARN se ajustó a 1 ng/ $\mu$ l para ZnT-8 o 1 pg/ $\mu$ l para el control de  $\alpha$ -actina. Los transcritos se amplificaron y después los productos de amplificación se analizaron, como se ha descrito en el ejemplo 2.

Los resultados ilustrados en la figura 2, muestran que el ARN que codifica la proteína ZnT-8 se expresa en las células de los islotes pancreáticos humanos fetales y adultos y en una línea de insulinoma de rata (INS-1), pero no en una línea de células epiteliales (línea Hela).

### **EJEMPLO 4: Expresión de una proteína de fusión ZnT-8/GFP**

La proteína es la proteína humana, codificada por el ADNc que corresponde a la secuencia SEC ID N°: 1 (ZnT-8). El producto de la PCR de 1123 pares de bases obtenido según el ejemplo 1, se digirió con la enzima de restricción *Xba*I, y después se clonó en el vector pcDNA3.1-CT-GFP (Invitrogen), para dar el vector denominado pZnT-8-GFP que se verificó por secuenciación.

El vector pZnT-8-GFP se transfectó de manera transitoria en una línea de células epiteliales (Hela) y de manera estable en una línea de insulinoma de rata (INS-1).

Las células epiteliales HeLa (número ATCC CCL-2) se cultivaron en medio Opti-MEM (medio de Eagle modificado, Life Technologies) complementado con suero de ternero al 5% descomplementado y glutamina 2 mM. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada enriquecida con CO<sub>2</sub> al 5%.

Las células INS-1 se cultivaron en medio RPMI (Life Technologies) complementado con: suero de ternero fetal (10%), 2-mercaptoetan-1-ol (50  $\mu$ M), piruvato sódico (1 mM), HEPES (10 mM), L-glutamina (2 mM), penicilina 100 U/ml y estreptomycin (100  $\mu$ g/ml).

Las células cultivadas en las cajas de Petri de 35 mm se transfectaron con el vector pZnT-8-GFP (1  $\mu$ g de ADN por  $10^6$  células), usando el reactivo Exgen500 (Euromedex) según las instrucciones del fabricante. Después de transfección con el vector pZnT-8-GFP, las células INS-1 se seleccionaron, se clonaron en el mismo medio que se añadió previamente de G418 400  $\mu$ g/ml, y después se observó la fluorescencia de los clones con un microscopio invertido de fluorescencia (Axiovert, Zeiss) usando los siguientes parámetros: longitud de onda de excitación: 450-490 nm; longitud de onda de emisión: 520 nm.

La expresión de la proteína de fusión ZnT-8-GFP en las células Hela, se analizó 48 horas después de la transfección, por observación de la fluorescencia como se ha indicado anteriormente para los clones de las células

INS-1 transfectadas de manera estable.

Los resultados ilustrados en la figura 3 (línea Hela) muestran que la proteína ZnT-8 está localizada en las vesículas intracitoplasmáticas, así como en la membrana plasmática; esta localización demuestra que la proteína ZnT-8 toma la vía de la excreción extracelular y se encuentra en la superficie de la célula.

Los resultados ilustrados en la figura 4 (línea INS-1) muestran que la proteína ZnT-8 está localizada en las vesículas de secreción de la insulina; esta localización indica que ZnT-8 está implicada en la maduración de la insulina; además, en la medida en que este experimento se realiza en el estado basal (en ausencia de estimulación por la glucosa) la proteína estará también presente sobre la membrana plasmática durante la exocitosis de la insulina, después de estimulación por la glucosa.

#### **EJEMPLO 5: Análisis de la secuencia de la proteína ZnT-8**

El análisis de la secuencia primaria de ZnT-8 y la predicción de los dominios transmembrana se realizaron con los programas TMpred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) y SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuimenu0.html>).

La proteína ZnT-8 completa posee 6 dominios transmembrana indicados anteriormente (aminoácidos 74-95, 107-126, 141-163, 177-196, 216-240, 246-267), situándose los extremos C y N terminales en el citoplasma.

#### **EJEMPLO 6: Preparación de un anticuerpo policlonal dirigido contra los bucles extracelulares (PEP1, PEP2 y PEP4) y contra un bucle intracelular (PEP3) de ZnT-8**

Los péptidos correspondientes a los epítomos que presentan las secuencias SEC ID N°: 7: PEP1: HIAGSLAVVTDAAHLL; SEC ID N°: 8: PEP2: CERLLYPDYQIQATV; SEC ID N°: 9: PEP3: CLGHNHKEVQANASVR, SEC ID N°: 10: PEP4: YFKPEYKIADPIC se sintetizaron en fase sólida, según el procedimiento descrito originalmente por Merrifield y col. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 85: 2149-) (1964), se purificaron y se conjugaron con una proteína transportadora (por ejemplo, albúmina). Los péptidos conjugados se inyectaron en conejos según el siguiente protocolo de inmunización:

D0: primera inmunización; D14: segunda inmunización; D28: tercera inmunización; D38: verificación de la especificidad; D56: cuarta inmunización; D66 y D80: recuperación del suero. El suero puede usarse directamente o después de purificación en columna de proteína A con una elución en medio ácido. Estas operaciones se realizaron por la sociedad Eurogentec SA, Bélgica.

#### **EJEMPLO 7: Marcaje fluorescente del anticuerpo obtenido en el ejemplo 6**

El anticuerpo se purifica por cromatografía de afinidad en una columna de proteína G (Pharmacia). La columna (1 ml) se equilibra con un tampón de fosfato sódico 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4, se carga con 5 ml de suero, y después se lava con 20 ml del mismo tampón para eluir las proteínas no fijadas. El anticuerpo después se libera con una solución de glicina, HCl 0,1 M, pH 2,5, y después se neutraliza con 40  $\mu$ l de tampón de Tris HCl 2 M, pH 10,0.

Se diluyen 2 mg de anticuerpo en 1 ml de tampón de fosfato, pH 8,0. Se prepara extemporáneamente una solución de NGS-FITC (SIGMA; 1 mg/ml en DMSO). Se mezclan 75  $\mu$ l de la solución de NHS-FITC con la solución de anticuerpo y después la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 45 minutos. El anticuerpo marcado se purifica en columna PD-10 (PHARMACIA) de la siguiente manera: la columna se lava con 30 ml de PBS, se carga con 1 ml de la solución de anticuerpo marcado que se va a purificar, después se recogen con 5 ml de PBS y fracciones de 2 ml; se conserva la segunda fracción que contiene el anticuerpo marcado.

#### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Soria B.: In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation* 2001; 68: 205-19.
2. Gores P.F., Sutherland D.E. Pancreatic islet transplantation: is purification necessary?, *Am. J. Surg.* 1993; 166 :538-42.
3. Bloc A., Cens T., Cruz H., Dunant Y., Zinc-induced changes in ionic currents of clonal rat pancreatic-cells: activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J. Physiol.* 2000; 529 Pt 3: 723-34.
4. Meyer K., Irminger J.C., Moss L.G., de Vargas L.M., Oberholzer J., Bosco D, y col.: Sorting human beta-cells consequent to targeted expression of green fluorescent protein. *Diabetes* 1998; 47 : 1974-7.
5. Giordano C., Stassi G., Todaro M., Richiusa P., Giordano M., Mattina A, y col.: Autofluorescence-activated sorting of human single beta cells and endocrine non-beta cells after enzymatic islet dissociation. *Transplant Proc.*; 1994; 26:651-2.
6. Lukowiak B., Vandewalle B., Riachy R., Kerr-Conte J., Gmyr V., Belaich S., y col.: Identification and purification of functional human beta-cells by a new specific zinc fluorescent probe. *J. Histochem. Cytochem.* 2001; 49 : 519-28.
7. Shiroy A., Yoshikawa M., Yokota H., Fukui H., Ishizaka S., Tatsumi K., y col.: Identification of Insulin-Producing Cells Derived from Embryonic Stem Cells by Zinc-Chelating Dithizone. *Stem Cells* 2002; 20 : 284-292.
8. Jiao L., Gray D.W., Gohde W., Flynn G.J., Morris P.J., *In vitro* staining of islets of Langerhans for fluorescence-activated cell sorting. *Transplantation* 1991; 52 : 450-2.
9. Kallan A.A., Roep B.O., Arden S.D., Hutton J.C., de Vries R.R.: Beta-cell reactive T-cell clones from type I diabetes patients are not beta cell specific and recognize multiple antigens. *J. Autoimmun.* 1995; 8 : 887-99.
10. Zalewski P.D., Millard S.H., Forbes I.J., Kapaniris O., Slavotinek A., Betts W.H. y col.: Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *J. Histochem.*

*Cytochem.* 1994; 42: 877-84.

11. Easom R.A. Beta-granule transport and exocytosis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2000; 11 : 253-66.

12. Palmiter R.D., Findley S.D., Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *Embo J.* 1995; 14: 639-49.

5 13. Sambrook J., Russell D.W. (2000) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

14. Bloc A. y col, *J. Physiol.* 2000, Dec. 15; 529 Pt 3 : 723-34.

15. Tomita T. *Pathology International* 2002; 52 : 425-432.

10 LISTA DE SECUENCIAS

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE/UNIVERSITE JOSEPH FOURIER SEVE Michel FAVIER Alain

<120> Proteína específica de células pancreáticas beta de los islotes de Langerhans y sus aplicaciones

15 <130> CGA263S8S

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 1110

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

atggagtttc ttgaaagaac gtatcttgtg aatgataaag ctgccaagat gcatgctttc      60
acactagaaa gtgtggaact ccaacagaaa ccggtgaata aagatcagtg tcccagagag      120
agaccagagg agctggagtc aggaggcatg taccactgcc acagtggctc caagcccaca      180
gaaaaggggg cgaatgagta cgcctatgcc aagtggaaac tctgttctgc ttcagcaata      240
tgcttcattt tcatgattgc agaggctgtg ggtgggcaca ttgctgggag tcttgctggt      300
gtcacagatg ctgccacct cttaattgac ctgaccagtt tctgtctcag tctcttctcc      360
ctgtggctgt catcgaagcc tccctctaag cggctgacat ttggatggca ccgagcagag      420
atccttggtg ccctgctctc catcctgtgc atctgggtgg tgactggcgt gctagtgtac      480
ctggcatgtg agcgcctgct gtatcctgat taccagatcc aggcgactgt gatgatcacc      540
gtttccagct gcgcagtggc ggccaacatt gtactaactg tggttttgca ccagagatgc      600
cttggccaca atcacaagga agtacaagcc aatgccagcg tcagagctgc ttttgtgcat      660
gcccttgag atctatttca gagtatcagt gtgctaatta gtgcacttat tatctacttt      720
aagccagagt ataaaatagc cgacceaatc tgcacattca tcttttccat cctgggtctg      780
gccagcacca tcactatctt aaaggacttc tccatcttac tcatggaagg tgtgccaag      840
agcctgaatt acagtgggtg gaaagagctt attttagcag tcgacggggt gctgtctgtg      900
cacagcctgc acatctggtc tctaacaatg aatcaagtaa ttctctcagc tcatgttgct      960
acagcagcca gccgggacag ccaagtggtt cggagagaaa ttgctaaagc ccttagcaaa     1020
agctttacga tgcactcact caccattcag atggaatctc cagttgacca ggaccccgac     1080
tgccctttct gtgaagacct ctgtgactag                                     1110
    
```

<210> 2

<211> 369

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

25

ES 2 361 639 T3

Met Glu Phe Leu Glu Arg Thr Tyr Leu Val Asn Asp Lys Ala Ala Lys  
 1 5 10 15

Met His Ala Phe Thr Leu Glu Ser Val Glu Leu Gln Gln Lys Pro Val  
 20 25 30

Asn Lys Asp Gln Cys Pro Arg Glu Arg Pro Glu Glu Leu Glu Ser Gly  
 35 40 45

Gly Met Tyr His Cys His Ser Gly Ser Lys Pro Thr Glu Lys Gly Ala  
 50 55 60

Asn Glu Tyr Ala Tyr Ala Lys Trp Lys Leu Cys Ser Ala Ser Ala Ile  
 65 70 75 80

Cys Phe Ile Phe Met Ile Ala Glu Val Val Gly Gly His Ile Ala Gly  
 85 90 95

Ser Leu Ala Val Val Thr Asp Ala Ala His Leu Leu Ile Asp Leu Thr  
 100 105 110

Ser Phe Leu Leu Ser Leu Phe Ser Leu Trp Leu Ser Ser Lys Pro Pro  
 115 120 125

Ser Lys Arg Leu Thr Phe Gly Trp His Arg Ala Glu Ile Leu Gly Ala  
 130 135 140

Leu Leu Ser Ile Leu Cys Ile Trp Val Val Thr Gly Val Leu Val Tyr  
 145 150 155 160

Leu Ala Cys Glu Arg Leu Leu Tyr Pro Asp Tyr Gln Ile Gln Ala Thr  
 165 170 175

Val Met Ile Ile Val Ser Ser Cys Ala Val Ala Ala Asn Ile Val Leu  
 180 185 190

Thr Val Val Leu His Gln Arg Cys Leu Gly His Asn His Lys Glu Val  
 195 200 205

Gln Ala Asn Ala Ser Val Arg Ala Ala Phe Val His Ala Leu Gly Asp  
 210 215 220

Leu Phe Gln Ser Ile Ser Val Leu Ile Ser Ala Leu Ile Ile Tyr Phe  
 225 230 235 240

Lys Pro Glu Tyr Lys Ile Ala Asp Pro Ile Cys Thr Phe Ile Phe Ser  
 245 250 255

Ile Leu Val Leu Ala Ser Thr Ile Thr Ile Leu Lys Asp Phe Ser Ile  
 260 265 270

Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu Asn Tyr Ser Gly Val Lys  
 275 280 285

Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu Ser Val His Ser Leu His  
 290 295 300

Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile Leu Ser Ala His Val Ala  
 305 310 315 320

Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val Arg Arg Glu Ile Ala Lys  
 325 330 335

Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu  
 340 345 350

Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu Phe Cys Glu Asp Pro Cys  
 355 360 365

Asp

5 <210> 3  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador

10 <400> 3  
 gatgctgccc acctcttaat tgac 24

15 <210>4  
 <211> 24  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 4  
 tcacatcttttc catcctggtc ttgg 24

<210> 5

<211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Cebador

<400> 5  
 actctagaat ggagtttctt gaaagaacgt a 31

10

<210> 6  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Cebador

<400> 6  
 aatctagagt cacaggggtc ttacaga 28

20

<210> 7  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25

<400> 7  
 His Ile Ala Gly Ser Leu Ala Val Val Thr Asp Ala Ala His Leu Leu  
 1 5 10 15

30

<210> 8  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35

<400> 8  
 Cys Glu Arg Leu Leu Tyr Pro Asp Tyr Gln Ile Gln Ala Thr Val  
 1 5 10 15

40

<210> 9  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9  
 Cys Leu Gly His Asn His Lys Glu Val Gln Ala Asn Ala Ser Val Arg  
 1 5 10 15

45

<210> 10  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 10  
 Tyr Phe Lys Pro Glu Tyr Lys Ile Ala Asp Pro Ile Cys  
 1 5 10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. El uso de un producto seleccionado entre: (i) una proteína que comprende o consiste en la proteína ZnT-8 de secuencia SEC ID N°: 2, (ii) un fragmento de al menos 15 aminoácidos consecutivos de ZnT-8, y (iii) una microplaca de proteína realizada con una proteína, como se define en (i) o un fragmento como se define en (ii), para detectar, en el suero de un individuo, la presencia de anticuerpos dirigidos contra las células beta de los islotes de Langerhans.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que se selecciona un fragmento de ZnT-8 entre los polipéptidos de las secuencias SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10, para detectar, en el suero de un individuo, en el suero de un individuo la presencia de anticuerpos dirigidos contra las células beta de los islotes de Langerhans
- 15 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que se utiliza una microplaca de proteína que comprende un fragmento de ZnT-8, seleccionado entre los polipéptidos de las secuencias SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10 para detectar, en el suero de un individuo, la presencia de anticuerpos dirigidos contra las células beta de los islotes de Langerhans.
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la presencia de anticuerpos dirigidos contra las células beta de los islotes de Langerhans se detecta por un procedimiento inmunológico y/o por un procedimiento inmunoenzimático.

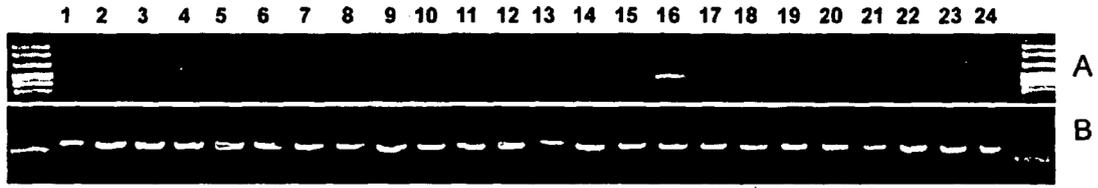


Figura 1

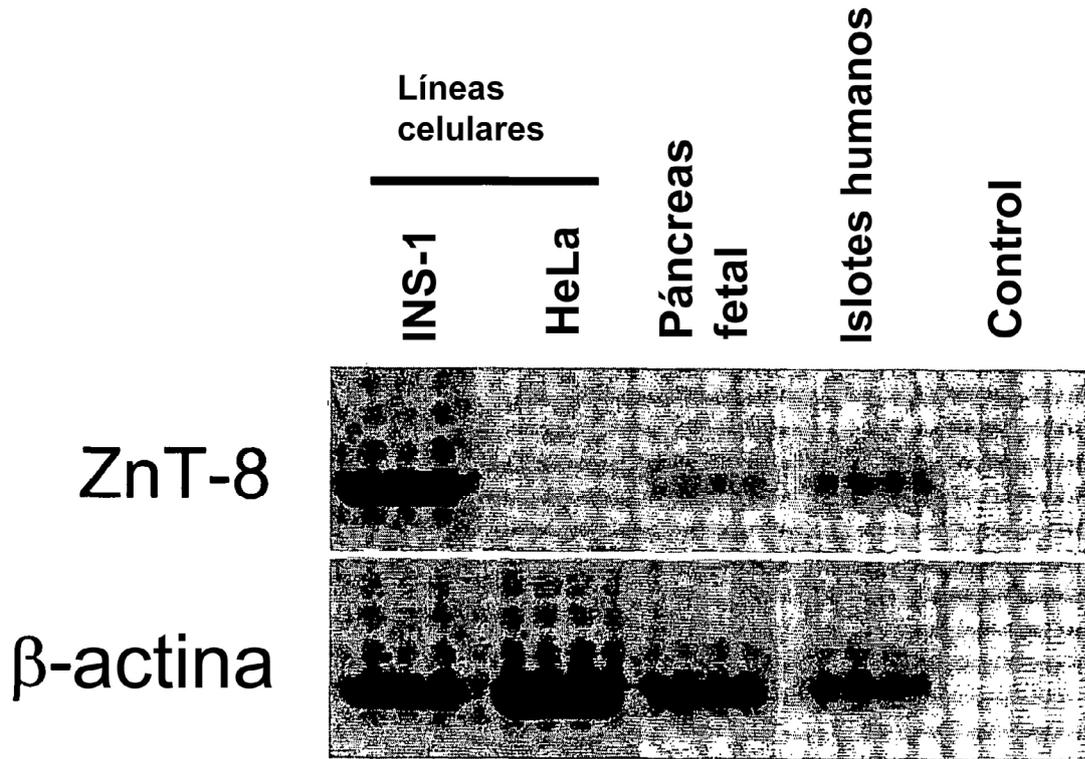
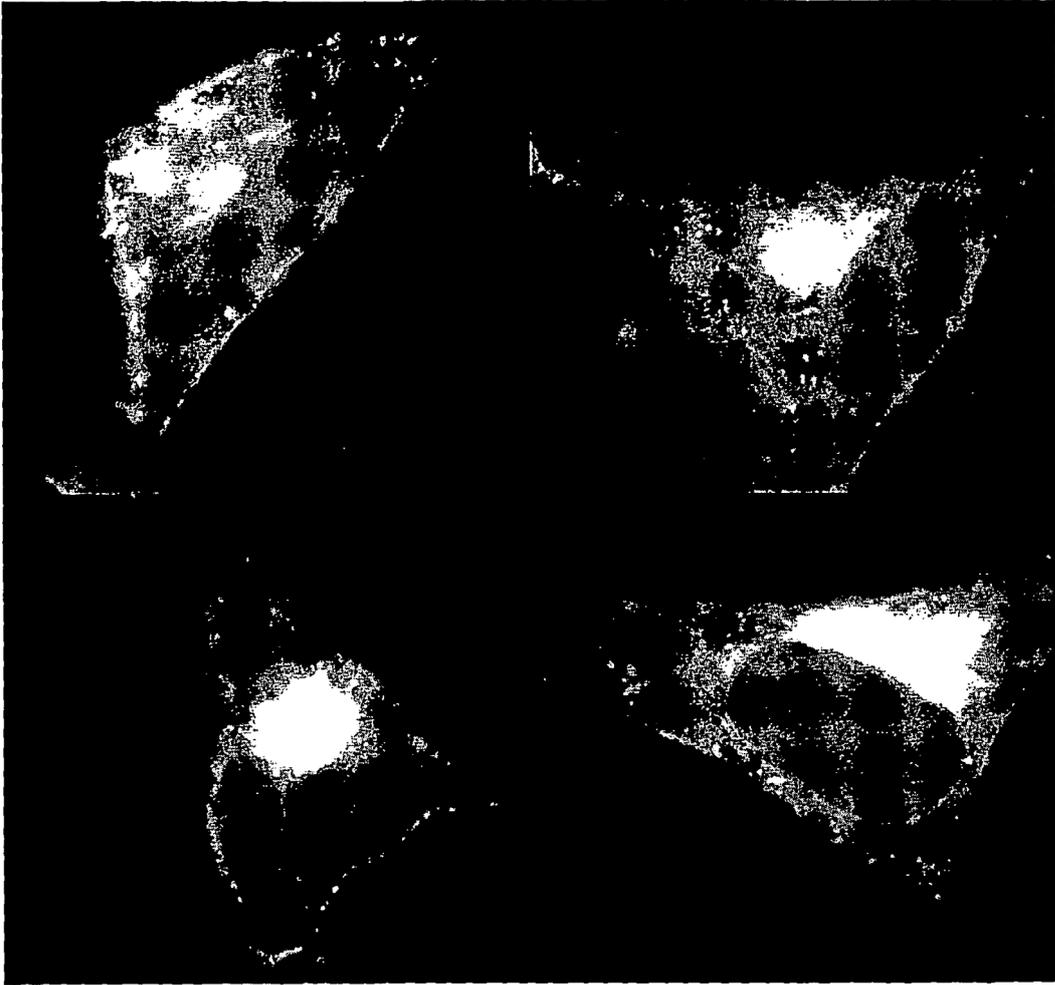
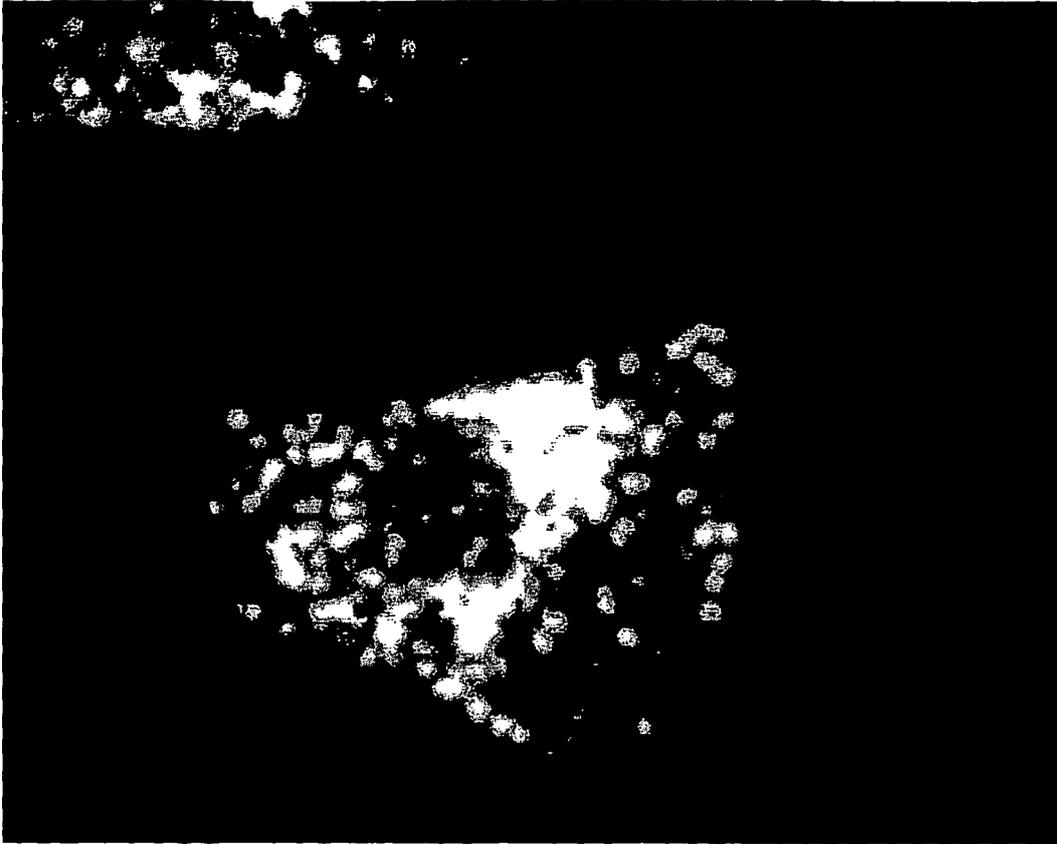


Figura 2



**Figura 3**



**Figura 4**

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

Esta lista de referencias citadas por el autor de la solicitud es sólo para la conveniencia del lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido mucho cuidado al recopilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP rechaza cualquier responsabilidad en este aspecto.

**5 Documentos de patente citados en la descripción.**

WO 9117186 A

WO 0224733 A

US 4683202 A

**10 Bibliografía de no patentes citada en la descripción**

**SAMBROOK J.; RUSSELL D.W.** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000

Purification of membrane proteins. **T.C. THOMAS; M.G. MCNAMEE.** Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification. Academic press, 1990, vol. 182, 499-520

**KENMOCHI T. y col.** *Pancreas*, 2000, vol. 20 (2), 184-90

**15 ASFARI M. y col.** *Endocrinology*, 1992, vol. 130 (1), 167-78

**MERRIFIELD y col.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, vol. 85, 2149

**SORIA B.** In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation*, 2001, vol. 68, 205-19

**20 GORES P.F.; SUTHERLAND D.E.** Pancreatic islet transplantation: is purification necessary. *Am. J. Surg.*, 1993, vol. 166, 538-42

**BLOC A.; CENS T.; CRUZ H.; DUNANT Y.** Zinc-induced changes in ionic currents of clonal rat pancreatic-cells: activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J. Physiol.*, 2000, vol. 529 (3), 723-34

**MEYER K.; IRMINGER J.C.; MOSS L.G.; DE VARGAS L.M.; OBERHOLZER J.; BOSCO D. y col.** Sorting human beta-cells consequent to targeted expression of green fluorescent protein. *Diabetes*, 1998, vol. 47, 1974-7

**25 GIORDANO C.; STASSI G.; TODARO M.; RICHIUSA P.; GIORDANO M.; MATTINA A. y col.** Autofluorescence-activated sorting of human single beta cells and endocrine non-beta cells after enzymatic islet dissociation. *Transplant. Proc.*, 1994, vol. 26, 651-2

**LUKOWIAK B.; VANDEWALLE B.; RIACHY R.; KERR-CONTE J.; GMYR V.; BELAICH S. y col.** Identification and purification of functional human beta-cells by a new specific zinc fluorescent probe. *J. Histochem. Cytochem.*, 2001, vol. 49, 519-28

**30 SHIROI A.; YOSHIKAWA M.; YOKOTA H.; FUKUI H.; ISHIZAKA S.; TATSUMI K. y col.** Identification of Insulin-Producing Cells Derived from Embryonic Stem Cells by Zinc-Chelating Dithizone. *Stem Cells*, vol. 20, 284-292

**JIAO L.; GRAY D.W.; GOHDE W.; FLYNN G.J.; MORRIS P.J.** *In vitro* staining of islets of Langerhans for fluorescence-activated cell sorting. *Transplantation*, 1991, vol. 52, 450-2

**35 KALLAN A.A.; ROEP B.O.; ARDEN S.D.; HUTTON J.C.; DE VRIES R.R.** Beta-cell reactive T-cell clones from type I diabetes patients are not beta cell specific and recognize multiple antigens. *J. Autoimmun.*, 1995, vol. 8, 887-99

**40 ZALEWSKI P.D.; MILLARD S.H.; FORBES I.J.; KAPANIRIS O.; SLAVOTINEK A.; BETTS W.H. y col.** Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *J. Histochem. Cytochem.*, 1994, vol. 42, 877-84

**EASOM R.A.** Beta-granule transport and exocytosis. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2000, vol. 11, 253-66

**PALMITER R.D.; FINDLEY S.D.** Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *Embo. J.*, 1995, vol. 14, 639-49

**BLOC A. y col.** *J. Physiol.*, 15 de diciembre 2000, vol. 529 (3), 723-34

**45 TOMITA T.** *Pathology International*, 2002, vol. 52, 425-432