

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 110**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2004 E 04751089 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 1623228**

54 Título: **ApoCIII y tratamiento y diagnóstico de la diabetes**

30 Prioridad:

29.04.2003 US 466517 P

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

13.03.2013

73 Titular/es:

**BIOCRINE AB (100.0%)
JOHN ERIKSSONGATAN 9
112 22 STOCKHOLM, SE**

72 Inventor/es:

BERGGREN, PER-OLOF

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 398 110 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

ApoCIII y tratamiento y diagnóstico de la diabetes.

5 **Antecedentes de la invención**

Los canales de Ca^{2+} de tipo-L que constituyen compuertas del voltaje tienen un importante papel fisiológico en la transducción de señales de las células β pancreáticas ("células β ") (1). Estos canales constituyen un enlace esencial entre cambios transitorios en el potencial de membrana y la liberación de insulina a partir de las células β . Los cambios en la concentración de Ca^{2+} libre citoplásmico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en las células β se asocian con la activación de un espectro de señales intracelulares y están estrictamente regulados, pues el alto $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es perjudicial para las células.

Juntti-Berggrem L. et al. SCIENCE, vol. 261, nº 5117, 2 de Julio de 1993, páginas 86-90 da a conocer que los bloqueantes de los canales de calcio de tipo-L activados por el voltaje pueden evitar la destrucción de las células β pancreáticas.

Rabinovitch A. et al. ENDOCRINOLOGY, vol. 142, nº 8, Agosto del 2001, páginas 3.649-3655, da a conocer que la expresión de Calbindina- D_{28k} en una progenie de células β de un isolote pancreático, protege contra la apoptosis inducida por citoquinas.

Tada N. et al. THE TOHOKU JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 141 Suppl, Diciembre de 1983, páginas 619-626, da a conocer que el grado de sialización de las apolipoproteínas en los diabéticos puede variar. Este documento no evalúa la sialización de las apolipoproteínas en individuos sanos.

Callow M.J. and Redgrave T.G. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1.168, nº 3, 1 de Julio, 1993, páginas 271-279, da a conocer un estudio sobre la distribución de isoformas de las apolipoproteínas E y CIII en ratas diabéticas, comparadas con ratas de control.

Davignon J. CANADIAN JOURNAL OF CARDIOLOGY, vol. 14, nº SUPPL B, Mayo de 1998, páginas 28B-38D, se refiere al tratamiento de la dislipidemia, pero no al de la diabetes tipo I.

Reverter J.L. et al. CLINICA CHIMICA ACTA, vol. 223, nº 1-2, 1993, páginas 113-120, da a conocer un estudio sobre los efectos de la terapia insulínica a pacientes de diabetes tipo I recientemente diagnosticados.

Alsayed N. et al. CLINICAL CHEMISTRY, vol. 34, nº 1, enero de 1988, páginas 49-52, se refiere a un procedimiento de purificación para anticuerpos anti-CIII apolipoproteínas.

Pérez A. et al. ARCHIVES OF INTERNAL MEDICINE, vol. 160, nº 18, 9 de octubre, 2000, páginas 2.756-2762, da a conocer que la dislipidemia es una enfermedad que puede asociarse con los diabéticos de tipo I y con pacientes que no padecen diabetes.

En este tipo I de diabetes (T1D), existe una destrucción específica de las células β pancreáticas que secretan insulina. Los sueros de pacientes diabéticos de tipo I(T1D) diagnosticados recientemente, han mostrado un aumento de la actividad de los canales de Ca^{2+} de tipo-L que constituyen compuertas del voltaje en las células β que da lugar a un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ después de la despolarización y apoptosis de las células β , efectos que pueden evitarse mediante bloqueadores de canales de Ca^{2+} (2). Sin embargo, no se ha determinado qué factor en el suero de los T1D es responsable de los cambios en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Se demuestra a continuación que la apolipoproteína CIII (apoCIII) aumenta en el suero de los pacientes T1D y que este factor sérico induce tanto un aumento de la concentración del Ca^{2+} citoplásmico libre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) como de la muerte de las células β .

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para identificar compuestos candidatos para el tratamiento de la diabetes tipo I *in vitro* que incluye poner en contacto las células β pancreáticas con una cantidad de apolipoproteína CIII ("apoCIII") efectiva para aumentar la concentración del calcio intracelular en presencia de uno o más compuestos de prueba, identificando aquellos que inhiben un aumento inducido por apoCIII en la concentración de calcio intracelular en las células pancreáticas β . En otro aspecto, la presente invención proporciona la utilización de un inhibidor de apoCIII seleccionado a partir del grupo formado por un anticuerpo selectivo de apoCIII, un oligonucleótido antisentido dirigido contra el ARN de apoCIII, y un ARN pequeño de interferencia dirigido contra el ARNm de apoCIII, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar la diabetes de tipo I, en la que la composición farmacéutica es para administrar a un paciente con la diabetes de tipo I una cantidad efectiva del inhibidor de apoCIII para reducir el aumento inducido por apoCIII en la concentración de calcio intracelular en las células pancreáticas β . En otro aspecto todavía, la presente invención proporciona utilizaciones de un inhibidor de apoCIII seleccionado a partir del grupo formado por un anticuerpo selectivo para apoCIII, un oligonucleótido

antisentido dirigido contra el ARNm de apoCIII, y un ARN pequeño de interferencia dirigido contra el ARNm de apoCIII, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar la diabetes de tipo I.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para el diagnóstico de una propensión a desarrollar diabetes de tipo I, que comprende la determinación de una cantidad de apoCIII sialilizado en una muestra sérica sanguínea de un individuo, y el diagnóstico de los individuos que presentan una cantidad elevada de apoCIII sialilizado en la muestra sérica sanguínea con respecto al control, como mostrando una propensión a desarrollar la diabetes de tipo I.

10 En otro aspecto, aún, la presente invención proporciona procedimientos para identificar pacientes diabéticos para ser tratados con terapia anti-apoCIII, que comprenden la determinación de una cantidad de apoCIII en una muestra de suero sanguíneo de un individuo diabético y compararla con una muestra control de suero sanguíneo; e identificar aquellos individuos con una cantidad elevada de apoCIII en la muestra de suero sanguíneo, respecto a la muestra control de suero sanguíneo, como siendo individuos a los que se les debe tratar con terapia anti-apoCIII, en la que los individuos que van a ser tratados con terapia anti-apoCIII, deben tratarse con un compuesto terapéutico apoCIII seleccionado del grupo formado por un anticuerpo apoCIII selectivo, un oligonucleótido antisentido dirigido contra el ARNm de apoCIII, y un ARN pequeño dirigido contra el ARNm de apoCIII.

Breve descripción de las figuras

20 **Figura 1.** Cambios en $[Ca^{2+}]_i$ en las células pancreáticas β de ratones expuestos a sueros T1D o de control. En cinco de los siete sueros T1D se indujo un aumento potenciado en $[Ca^{2+}]_i$, cuando las células se despolarizaron con altas concentraciones de K^+ para abrir el canal de Ca^{2+} compuerta del voltaje, comparado con las células que se expusieron a suero normal ($n = 29, 28, 32, 47, 21, 27, 31$ y 18 , respectivamente), $***P < 0,001$, $**P < 0,01$ y $*P < 0,05$ con respecto al control.

30 **Figura 2.** Separación gradual paso e identificación de la fracción activa en el suero T1D A, Después de la primera separación mediante RP-HPLC, se descubrió que en la fracción marcada 3, se daba un aumento más alto en $[Ca^{2+}]_i$; B, La fracción 3 (Fig. 2A) se reprocesó secundariamente mediante RP-HPLC bajo condiciones idénticas. Las fracciones se ensayaron otra vez con respecto a la actividad estimulante de $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 2C), identificándose una fracción positiva ($n^o 2$). D, la fracción activa (Fig. 2B) se volvió a someter a cromatografía. La fracción, que indujo un aumento más alto en $[Ca^{2+}]_i$ cuando las células β se despolarizaron con concentraciones altas de K^+ , se señala con una línea. C, Las células β pancreáticas incubadas con cuatro fracciones procedentes de RP-HPLC de sueros diabéticos a partir de la Fig. 2B ($n = 6, 11, 12, 11$ y 10 respectivamente), $*** P < 0,001$ con respecto al control. E, la fracción activa de la Fig. 2C se analizó mediante espectrometría de masas por electropulverización.

40 **Figura 3.** Cantidades de apoCIII en suero T1D y efectos en $[Ca^{2+}]_i$ y muerte celular, A, niveles relativos de apoCIII₁₊₂ en suero T1D y de control, dados como área bajo la curva (AUC), $**P < 0,01$ ($n=5$). B, células pancreáticas β se incubaron con apoCIII o apoCIII + anticuerpos contra apoCIII humano ($n=63, 35$ y 33), $***P < 0,001$ respecto al control C, las células β se incubaron con un control o un suero T1D y un suero T1D + anti-apoCIII ($n= 18, 17$ y 20), $***P < 0,001$ con respecto al suero T1D. D, Las células β de ratón se incubaron con apoCIII₀, apoCIII₁, apoCIII₂ o el vehículo (control) ($n=54, 40, 48, 37$), $***P < 0,001$ con respecto al control. E, la progenie celular secretora de insulina RINm5F se expuso a los sueros de control y del T1D, y al suero T1D con la adición de dos concentraciones de anti-apoCIII, y finalmente, al suero de control con apoCIII ($n=5$), $*P < 0,05$ y $**P < 0,01$ con respecto al control.

50 **Figura 4.** Interacción de apoCIII con canal de Ca^{2+} de tipo-L compuerta del voltaje. A, Gráfico sumarial de las relaciones densidad de la corriente-voltaje. Las células tratadas con apoCIII (círculos rellenos, $n = 56$) y las células de control (círculos abiertos, $n = 55$) se despolarizan a potenciales de entre -60 y 50 mV, en incrementos de 10 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -70 mV, $*P < 0,05$. B, trazas de corrientes de Ca^{2+} de muestras de células completas a partir de una célula de control (capacitancia celular: $4,3$ pF) y célula incubada con apoCIII (capacitancia celular: $4,2$ pF). Las células se despolarizaron mediante un conjunto de impulsos de voltaje (100 ms, $0,5$ Hz) entre -60 y 50 mV, en incrementos de 10 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -70 mV.

Descripción detallada de la invención

55 En la presente memoria, si no se indica lo contrario las técnicas que se utilizan pueden encontrarse en cualesquiera de las diversas referencias bien conocidas tales como: Molecular cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol. 185, editado por D. Goeddel, 1991, Academic Press, San Diego, CA), "Guide to Protein Purification" en Methods in Enzymology (M.P. Deutshcer, ed., (1990), Academic Press, Inc.); Protocolos PCR: A Guide to Methods and Applications (Innis, et al., 1990, Academic Press, San Diego, CA), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2ª Ed. (R.I. Freshney, 1987, Liss, Inc. New York, NY), Gene Transfer and Expression Protocols, pp. 109-128, ed. E.J. Murria, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.), y Ambion 1998 Catalog (Ambion, Austin, TX).

65 En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para identificar compuestos candidatos para el tratamiento de la diabetes tipo I *in vitro*, que comprenden el contacto de las células pancreáticas B con una cantidad

efectiva de apolipoproteína ("apoCIII") efectiva para aumentar la concentración intracelular de calcio en presencia de uno o más de los compuestos de prueba, e identificar aquellos compuestos que inhiben el aumento inducido por apoCIII en la concentración de calcio intracelular en las células pancreáticas β .

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, "apoCIII" se refiere a una proteína que comprende la secuencia aminoácida que se muestra en SEC ID n° 2 (humana) (n° NCBI de registro CAA 25233), SEC ID n° 4 (rata) (n° NCBI de registro AAA40746), SEC ID n° 6 (macaco) (n° NCBI de registro CAA 48419, (n° NCBI de registro NP_075603), SEC ID n° 8 (rata) o sus equivalentes funcionales.

10 La apoCIII puede ser apoCIII sustancialmente purificada, disponible, por ejemplo, en Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), donde "sustancialmente purificada" significa que es eliminada a partir de su entorno celular normal *in vivo*. Alternativamente, apoCIII puede estar presente en una mezcla, tal como el suero sanguíneo del tipo diabético I o purificarse completa o parcialmente utilizando técnicas estándar, tal como las que se describen a continuación. En una forma de realización preferida, se utiliza apoCIII sustancialmente purificada.

15 Tal como se expone a continuación, existen tres isoformas conocidas de la apoCIII humana que tienen idéntica secuencia aminoácida, pero que difieren en su patrón de glicosilación. Así, en una forma de realización preferida, se utiliza apoCIII glicosilada, en la que la glicosilación es, preferentemente, sialilación. En formas de realización especialmente preferidas, se utiliza la apoCIII mono-sialilizada o di-sialilizada. Dichas formas glicosiladas pueden obtenerse a partir, por ejemplo, de Sigma Chemical Company, pudiéndose purificar parcial o totalmente utilizando técnicas estándar, tal como las que se describen a continuación.

25 Tal como se utilizan en la presente invención, "células β pancreáticas" constituye cualquier población celular que comprende células β de los islotes pancreáticos. Las células pueden obtenerse a partir de cualquier especie de mamífero. Dichas poblaciones de células β de los islotes pancreáticos incluyen el páncreas, islotes pancreáticos aislados de Langerhans ("islotes pancreáticos"), células aisladas de los islotes β pancreáticos, y progenies de células que secretan insulina. Los procedimientos para el aislamiento pancreático son bien conocidos en la técnica, y procedimientos para aislar islotes pancreáticos, pueden encontrarse en Cejvan et al., Diabetes 52:1176-1181 (2003); Zambre et al., Biochem. Pharmacol. 57:1159-1164 (1999), y Fagan et al., Surgery 124:254-259 (1998), y las referencias citadas en esta bibliografía. Las progenies celulares que secretan insulina están disponibles en la American Tissue Culture Collection ("ATCC")(Rockville, MD). En una forma de realización posterior en la que se utilizan las células β pancreáticas, se obtienen a partir de ratones ob/ob, que contienen más del 95% de células β en sus islotes, y están comercialmente disponibles.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, "concentración de calcio intracelular" se refiere a la concentración Ca^{2+} de $[Ca^{2+}]_i$ libre citoplásmico en las células β pancreáticas. Dichas concentraciones pueden medirse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como la utilización de indicadores fluorescentes del calcio, tal como se expone en la presente memoria.

40 Tal como se utiliza aquí "aumento en la concentración de calcio intracelular", se refiere a su aumento durante la realización del ensayo por encima de lo visto en ausencia de los compuestos del ensayo. El procedimiento no requiere una cantidad específica de aumento en la concentración de calcio intracelular con respecto a la concentración basal, siempre que el o los compuestos promuevan un aumento en la concentración intracelular de calcio de forma superior a la apreciada en ausencia de los compuestos de prueba. En una forma de realización preferida, el aumento es uno estadísticamente significativo medido mediante determinaciones estadísticas estándares.

45 La puesta en contacto de las células pancreáticas β con apoCIII puede tener lugar antes, después, o simultáneamente del contacto de las células con uno o varios compuestos de prueba. El contacto puede ser *in vitro* o *ex vivo*.

50 La presente invención proporciona además compuestos que se identifican mediante los anteriores procedimientos de escaneo y su utilización para la preparación de una composición farmacéutica o para tratar a los individuos con la diabetes tipo I.

55 En otra forma de realización, los procedimientos comprenden además la síntesis de los compuestos de prueba que inhiben el aumento inducido por apoCIII en la concentración intracelular de calcio en las células β pancreáticas.

60 Cuando los compuestos de prueba comprenden secuencias polipeptídicas, dichos polipéptidos pueden ser sintetizados químicamente o expresarse de forma recombinante. La expresión recombinante puede llevarse a cabo utilizando procedimientos estándares en la técnica, tal como se ha dado a conocer anteriormente. Dichos vectores de expresión pueden incluir vectores bacterianos o víricos de expresión, y dichas células huéspedes pueden ser procarióticas o eucarióticas. Los polipéptidos sintéticos, preparados utilizando las técnicas bien conocidas de fase sólida, fase líquida, o técnicas de condensación peptídica, o cualquiera de sus combinaciones, pueden incluir aminoácidos naturales o no. Los aminoácidos que se utilizan para la síntesis peptídica pueden ser resino aminoácidos estándar Boc (N α -amino protegido N α -t-butiloxicarbonil) con protocolos de desprotección

estándar, neutralización, acoplamiento y lavado, o aminoácidos estándar básicos lábiles $N\alpha$ -amino protegidos 9-fluoronilmetoxycarbonil (Fmoc). Tanto los aminoácidos protegidos Fmoc como los Boc $N\alpha$ -amino, pueden obtenerse de Sigma, Cambridge Research Biochemical, o de otras compañías químicas familiares para los expertos en la materia.

5 Además, los polipéptidos # para la preparación de una composición farmacéutica pueden sintetizarse con otros grupos $N\alpha$ -protectores que resultan conocidos por los expertos en la materia. La síntesis peptídica en fase sólida puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas para los expertos en la materia y proporcionarse de forma tal como utilizando sintetizadores automatizados.

10 Cuando los compuestos de prueba comprenden anticuerpos, dichos anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los anticuerpos pueden humanizarse, completamente humanos o ser formas murinas de los anticuerpos. Dichos anticuerpos pueden obtenerse mediante procedimientos bien conocidos, tales como los que se describen en Harlow and Lane, *Antibodies*; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988). En un ejemplo, antes de la primera inmunización con, por ejemplo, apoCIII, se recoge el suero preinmune. Un apoCIII purificado sustancialmente, o sus fragmentos antigénicos, junto con un adyuvante apropiado, se inyectan en un animal en una cantidad y a unos intervalos suficientes para provocar una respuesta inmune. Los animales son sangrados a intervalos regulares, de preferencia semanalmente, para determinar el título de anticuerpos. Los animales pueden o no recibir inyecciones de revacunación después de la inmunización inicial. A los 20 7 días aproximadamente después de cada inmunización de recuerdo, o a una semana aproximadamente después de una única inmunización, los animales se sangran, se recupera el suero, almacenándose a alrededor de -20°C . Los anticuerpos policlonales contra apoCIII, pueden purificarse entonces directamente haciendo pasar el suero recogido desde el animal a través de una columna a la cual se unen proteínas no relacionadas antigénicamente, preparadas a partir del mismo sistema de expresión sin apoCIII unido.

25 Los anticuerpos monoclonales pueden producirse obteniendo células del bazo a partir del animal (véase Kohler and Milstein, *Nature* 256, 495-497 (1975)). En un ejemplo, se preparan anticuerpos monoclonales (mAb) de interés, inmunizando ratones endogámicos con apoCIII, o con un fragmento antigénico suyo. Los ratones se inmunizan por vías intraperitoneal o subcutánea, en una cantidad y a intervalos suficientes para provocar una respuesta inmune. Los ratones reciben una inmunización inicial en el día 0, y descansan durante aproximadamente de 3 a 30 semanas. A los ratones inmunizados se les administran una o más inmunizaciones "de recuerdo" por vía intravenosa (IV). Los linfocitos de los ratones con anticuerpos positivos, se obtienen extrayendo los bazos de los ratones inmunizados mediante procedimientos estándares conocidos en la técnica. Las células híbridoma se producen mezclando los linfocitos esplénicos con una pareja apropiada de fusión bajo condiciones que permitan la formación de híbridomas estables. Las células productoras de anticuerpos y las células pareja de fusión se fusionan en polietilenglicol a 35 concentraciones de alrededor del 30% al 50%. Las células de híbridoma fusionadas se seleccionan por su crecimiento en hipoxantina, timidina y aminopterina, suplementadas con Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los líquidos del sobrenadante se recuperan a partir de los pocillos de crecimiento positivo y se escanean con respecto a la producción de anticuerpos mediante un inmunoensayo tal como un inmunoradiensayo en fase sólida. Las células del híbridoma de los pocillos positivos a los anticuerpos se clonan mediante una técnica tal como la del agar blando de MacPherson, Técnicas del agar blando, en *Tissue Culture Methods and Applications*, Kruse and Paterson, Eds. Academic Press, 1973.

45 "Anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos derivados de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo monoclonal de ratón. Alternativamente, los anticuerpos humanizados pueden derivarse de anticuerpos quiméricos que conservan o lo hacen sustancialmente las propiedades de unión antigénica del anticuerpo no humano parental, pero que muestra una inmunogenicidad disminuida cuando se compara al anticuerpo parental cuando se administra al hombre. Por ejemplo, los anticuerpos quiméricos pueden incluir fragmentos de anticuerpos murinos y humanos, con, generalmente, regiones variables murinas y humanas constantes. Ya que los anticuerpos humanizados son 50 menos inmunogénicos en el hombre que los anticuerpos monoclonales no humanos se prefieren para una utilización subsiguiente terapéutica de los anticuerpos.

Los anticuerpos humanizados pueden prepararse utilizando diversos procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitándose (1) al injerto de regiones determinantes complementarias, procedentes de un anticuerpo monoclonal no humano sobre un marco humano y región constante ("humanizante") y (2) transplantando los dominios variables del anticuerpo monoclonal no humano, pero envolviéndolos con una superficie de tipo humano, reemplazando los residuos de la superficie ("revestimiento"). Estos procedimientos se dan a conocer, por ejemplo, en, por ejemplo, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeyer et al., *Science* 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immunol.* 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immunol.* 31(3):169-217 (1994); y Kettleborough, C.A. et al., *Protein Eng.* 4(7):773-83 (1991).

El término anticuerpo tal como se utiliza en la presente invención, tiene la intención de incluir fragmentos del anticuerpo que reaccionan selectivamente con apoCIII, o sus fragmentos. Los anticuerpos pueden fragmentarse utilizando técnicas convencionales, y los fragmentos, escanearse con respecto a la utilidad, de la misma forma que se ha descrito en la presente invención para todos los anticuerpos. Por ejemplo, los fragmentos $F(ab')_2$ pueden

generarse tratando los anticuerpos con pepsina. El fragmento resultante $F(ab')_2$ puede tratarse para reducir los enlaces disulfuro para dar lugar a fragmentos Fab'.

5 Tal como se utiliza en la presente invención, "que reaccionan selectivamente" hace referencia a que los anticuerpos reconocen uno o más epitopos dentro de apoCIII, pero posee poca o nula reactividad con las proteínas de control, tales como la albúmina sérica bovina, bajo condiciones estándar tales como las que se dan a conocer en esta invención.

10 Cuando los compuestos de prueba comprenden secuencias ácido nucleicas, tales ácidos nucleicos pueden sintetizarse químicamente o también, expresarse de modo recombinante. Las técnicas de expresión recombinante son bien conocidas por los expertos en la materia (véase por ejemplo, Sambrook, et al., 1989, *supra*). Los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN, y pueden ser mono o bi-catenarios. De forma similar, dichos ácidos nucleicos pueden sintetizarse química o enzimáticamente mediante reacciones manuales o automatizadas, utilizando procedimientos estándares en la técnica. Si se sintetiza químicamente o mediante síntesis enzimática *in vitro*, el ácido nucleico puede purificarse antes de introducirlo en la célula. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden purificarse a partir de una mezcla mediante extracción con un disolvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía, o una combinación de ellos. Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden utilizarse sin o con una purificación mínima, para evitar pérdidas debidas al procesamiento de las muestras.

20 Cuando los compuestos de prueba comprenden compuestos distintos a los polipéptidos, anticuerpos, o ácidos nucleicos, dichos compuestos puedan obtenerse mediante cualquiera de los distintos procedimientos de la técnica para llevar a cabo la síntesis química orgánica.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona las utilizaciones de un inhibidor de apoCIII para la preparación de una composición farmacéutica para tratar la diabetes tipo I, en la que la composición farmacéutica está destinada a ser administrada a pacientes con diabetes de tipo I en una cantidad efectiva de un inhibidor de apoCIII para reducir el aumento inducido por apoCIII en la concentración de calcio intracelular en las células β pancreáticas. Tal como se utiliza en la presente invención, un "inhibidor" de apoCIII incluye compuestos que reducen la transcripción de ADN apoCIII en ARN, compuestos que reducen la traducción del ARN de apoCIII en proteínas y compuestos que reducen la función de la proteína apoCIII. Dicha inhibición puede ser completa o parcial, tal que disminuye la expresión y/o la actividad de apoCIII, dando lugar a una capacidad reducida para aumentar la concentración de calcio intracelular. Dichos inhibidores son seleccionados a partir del grupo formado por anticuerpos que se unen al apoCIII; oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la proteína apoCIII, ADN, o ARNm; ARNs pequeños interferentes dirigidos contra la proteína apoCIII, ADN, o ARNm, y cualquier otro compuesto químico o biológico que pueda interferir con la actividad apoCIII. En una forma de realización, el inhibidor se identifica utilizando los componentes de esta invención. En otra forma de realización el inhibidor se selecciona a partir del grupo formado por (a), anticuerpos selectivos de apoCIII, (b), constructos ácido nucleicos antisentido derivados de la secuencia ARNm de apoCIII (SEC ID n^{os} 1, 3 y 5) (números NCBI de registro X00567 (hombre); J02596 (rata); y X68359 (macaco) respectivamente), y (c) secuencias pequeñas de ARN interferente derivadas de la secuencia ARNm de apoCIII (SEC ID n^{os} 1, 3, 5 y 7) (n^o NCBI de registro X00567 (hombre); J02596 (rata); X68359 (macaco) y NM_023114 (ratón) respectivamente).

45 Los procedimientos para obtener anticuerpos contra apoCIII o sus fragmentos, se dan a conocer anteriormente. Los anticuerpos contra apoCIII están comercializados (por ejemplo por la Academy BioMedical Company (Texas, USA) Chemicon International (California, USA); United States Biological (Massachusetts, USA), Novus Biologicals (Colorado, USA) Rockland Immunochemicals (Pennsylvania, USA).

50 Los procedimientos para obtener oligonucleótidos antisentido y pequeñas secuencias interferentes de ARN contra la secuencia ARNm de apoCIII, son bien conocidos por los expertos en la materia, que se basan en las secuencias apoCIII que se dan a conocer en esta invención. Los oligonucleótidos antisentido serán complementarios al ARNm expresado a partir del gen apoCIII, para unirse al ARNm, con objeto de inhibir la traducción.

55 En una forma de realización preferida para utilizar ARNs pequeños interferentes, los ARNs son ARNs dicarióticos. Los procedimientos para utilizar dichos ARNs dicarióticos son tal como se describen, por ejemplo, en la US n^o 6.506.559. Por ejemplo, el ARN puede sintetizarse *in vivo* o *in vitro*. La ARN polimerasa endógena celular puede mediar la transcripción *in vivo*, o puede utilizarse la ARN polimerasa clonada para la transcripción *in vivo* o *in vitro*. Para la transcripción a partir de un transgen *in vivo* o de un constructo de expresión, puede utilizarse para transcribir la cadena (o cadenas) del ARN, una región reguladora (por ejemplo, promotor, potenciador, silenciador, dador y aceptor de corte y empalme, poliadenilación). Las cadenas del ARN pueden o no pueden estar poliadeniladas; las cadenas de ARN pueden o no ser traducidas a un polipéptido mediante un dispositivo traduccional celular. El ARN puede sintetizarse química o enzimáticamente mediante reacciones manuales o automatizadas. El ARN puede sintetizarse mediante una ARN polimerasa celular o una bacteriógrafo ARN polimerasa (ejemplo T₃, T₇, SP6). Si el ARN se sintetiza químicamente o mediante síntesis enzimática *in vitro*, el ARN puede purificarse antes de la introducción en la célula. Por ejemplo, el ARN puede purificarse a partir de una mezcla mediante extracción con un disolvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía, o sus combinaciones. Alternativamente, el ARN puede utilizarse sin o con un mínimo de purificación para evitar pérdidas debido al procesamiento de las muestras.

El ARN puede secarse para almacenarlo o disolverlo en una solución acuosa. La solución puede contener tampones o sales para promover la hibridación y/o la estabilización de las cadenas dúplex.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona también composiciones farmacéuticas, que incluyen un inhibidor de la actividad de apoCIII y un portador farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización preferida, el inhibidor de apoCIII es seleccionado a partir del grupo formado por un anticuerpo que reacciona con apoCIII o un fragmento suyo, un oligonucleótido antisentido contra la secuencia ARNm de apoCIII, y una pequeña secuencia de ARN interferente dirigida contra la secuencia ARNm de apoCIII.

10 Los inhibidores pueden mezclarse con lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanóicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos sulfúrico y fosfórico, acacia, gelatina, alginato sódico, polivinilpirrolidina, y/o alcohol polivinílico, presentándose en forma de comprimidos o cápsulas para administrarlos convencionalmente. Alternativamente, los inhibidores pueden disolverse en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, soluciones coloidales de carboximetil celulosa, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semillas de algodón, aceite de sésamo, goma de tragacanto, y/o varios tampones. En la técnica farmacéutica son bien conocidos otros adyuvantes y modos de administración. Los portadores o diluyentes pueden incluir materiales de retraso temporal, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solos o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica.

20 El inhibidor puede obtenerse en forma sólida (incluyendo gránulos, polvos o supositorios) o en forma líquida (por ejemplo, soluciones, suspensiones, o emulsiones). El inhibidor puede aplicarse en forma de distintas soluciones. Las soluciones apropiadas para uso, según la invención son estériles, disuelven cantidades suficientes del anticuerpo, y no son dañinas para la aplicación propuesta. El inhibidor puede someterse a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o puede contener adyuvantes convencionales, tales como conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsificantes, tampones, etc.

25 Así, en otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para diagnosticar la propensión a desarrollar la diabetes tipo I, que comprende:

- 30 (a) determinar una cantidad de apoCIII sialilizada en una muestra sérica sanguínea de un individuo;
- (b) comparar la cantidad con una cantidad de apoCIII sialilizado en una muestra sérica sanguínea de control; y
- 35 (c) diagnosticar aquellos individuos con una cantidad elevada de apoCIII sialilizado en la muestra sérica sanguínea con respecto al control, como teniendo propensión a desarrollar una diabetes de tipo I.

40 Tal como se utiliza en la presente invención, "la muestra sérica sanguínea de control" puede ser cualquier control significativo que proporcione un estándar apropiado contra el que se compara la cantidad de apoCIII sialilizado en la muestra sérica del individuo, incluyendo, pero no limitándose a las muestras séricas sanguíneas de un individuo no diabético; muestras séricas sanguíneas previas procedentes del individuo que estaba siendo tratado, y estándares de referencia conocidos.

45 Tal como se da a conocer en la presente invención, se descubrió que las formas sialilizadas de apoCIII predominan en los pacientes diabéticos de tipo I, y que el análisis de los niveles de apoCIII sialilizado en el suero sanguíneo con respecto a los controles, proporcionarán una lectura mejor para diagnosticar pacientes con diabetes de tipo I o con una propensión a desarrollar diabetes de tipo I, que el análisis de los niveles de apoCIII como un todo.

50 En otra forma de realización, es analizado el nivel de apoCIII monosialilizado en el individuo, respecto al control; en otra forma de realización, se analiza el nivel del apoCIII disialilizado en el individuo, con respecto al control; y en otra forma de realización, se llevan a cabo ambas mediciones.

55 El procedimiento no necesita una cantidad específica de aumento en el apoCIII sialilizado en la muestra sérica sanguínea sobre el control, aunque se prefiere que el aumento constituya un aumento estadísticamente significativo cuando se determina mediante mediciones estadísticas estándar.

Los procedimientos de diagnóstico de la invención pueden utilizarse en combinación con cualesquiera otros procedimientos de diagnóstico que se conocen en la técnica, para aumentar la exactitud de los ensayos.

60 En otro aspecto, esta invención proporciona procedimientos para identificar pacientes diabéticos que vayan a tratarse con terapia anti-apoCIII, que incluyen:

- (a) determinación de una cantidad de apoCIII en una muestra sérica sanguínea de un individuo diabético, y compararla con una muestra sérica sanguínea de control, y
- 65 (b) identificar aquellos individuos con una cantidad elevada de apoCIII en la muestra sérica sanguínea con respecto a la muestra sérica sanguínea de control, como individuos para ser tratados con terapia anti-apoCIII,

donde los individuos que van a ser tratados con terapia anti-apoCIII, lo van a ser con un compuesto terapéutico apoCIII seleccionado a partir del grupo formado por un anticuerpo selectivo para apoCIII, un oligonucleótido antisentido dirigido contra el ARNm de apoCIII, y un pequeño ARN de interferencia dirigido contra el ARNm de apoCIII.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la "muestra sérica sanguínea de control", puede consistir en cualquier control significativo que proporcione un estándar apropiado contra el que comparar la cantidad de apoCIII en la muestra sérica del individuo, incluyendo pero no limitándose a las muestras séricas sanguíneas de los individuos diabéticos que no se benefician o no se han beneficiado de la terapia anti-apoCIII, a las muestras séricas sanguíneas previas del individuo que se ha tratado y a los estándares conocidos de referencia.

Los compuestos terapéuticos anti-apoCIII incluyen, pero no se limitan a, compuestos de prueba identificados por los procedimientos de la invención como inhibidores del aumento inducido por apoCIII en la concentración intracelular de calcio en las células pancreáticas β ; anticuerpos apoCIII; y ácidos nucleicos antisentido y pequeños ARNs de interferencia que se unen selectivamente al ARNm de apoCIII tal como se da a conocer en la presente memoria.

En este aspecto, los procedimientos de la invención proporcionan unos medios para identificar la población de pacientes que más se beneficiarán de la terapia anti-apoCIII, y por tanto, que minimizarán la utilización de procedimientos terapéuticos en aquellos pacientes que no se beneficiarán. Dichos pacientes pueden ser cualquier población de pacientes que se beneficiará de la terapia anti-apoCIII, preferentemente pacientes diabéticos (tipo I ó II), y muy preferentemente los pacientes diabéticos de tipo I.

Según este aspecto de la invención, la cantidad de apoCIII puede ser la de apoCIII total o, preferentemente, del apoCIII sialilizado. En otras formas de realización se analiza el nivel de apoCIII monosialilizado en el individuo con respecto al control; en otra forma de realización, se analiza el nivel de apoCIII disialilizado en el individuo, con respecto al control; y en otra forma de realización, se llevan a cabo ambas mediciones.

El procedimiento no requiere una cantidad específica de aumento en apoCIII en la muestra sérica sanguínea sobre el control, aunque es preferible que el aumento sea un aumento estadísticamente significativo, determinado mediante mediciones estadísticas estándares.

Ejemplos

Materiales y Métodos

Medios: El medio basal, utilizado tanto para el aislamiento celular como para los experimentos, fue un tampón HEPES (pH 7,4), que contenía (en mM): 125 NaCl, 5,9 KCl, 1,3 CaCl₂, 1,2 MgCl₂, 25 HEPES. Se añadió albúmina sérica bovina al medio, a una concentración de 1 mg/ml. Para el cultivo celular, el medio RPMI 1640 se suplementó con 100 μ g/ml de estreptomycin, 100 IU de penicilina y un 10% de suero humano normal o diabético, o fetal de ternera.

Preparación de las células: Ratones adultos de una colonia local (3) se mantuvieron hambrientos por la noche. Se aislaron los islotes pancreáticos mediante una técnica colagenásica preparándose las suspensiones celulares tal como se ha descrito previamente (4,5). Las células se sembraron sobre cubresobjetos de vidrio y se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en aire.

Preparación y purificación de los sueros: Se recuperaron sueros procedentes de pacientes T1D y de individuos de control, procesándose de forma idénticamente estéril y almacenándose congelados a -20°C hasta que se utilizaron. Los sueros se inactivaron térmicamente mediante incubación a 56°C durante 30 minutos. Entonces, las células β se incubaron por la noche en medio de cultivo RPMI 1640 con el 10% de suero, conservándose los cambios en el [Ca²⁺]_i, subsiguiente a la despolarización con 25 mM KCl. Los cinco sueros T1D que indujeron una respuesta potenciada del [Ca²⁺]_i, se centrifugaron, haciéndose pasar el sobrenadante a través de un filtro estéril de 0,45 μ m. Las muestras se cargaron en Sep-Pak C₁₈ (Waters, Ma) precondicionadas con TFA al 0,1%. Después de un lavado con TFA al 0,1%, se eluyeron las proteínas con acetonitrilo al 60% en TFA al 0,1%, liofilizándose entonces. Lotes de 1 miligramo de la muestra liofilizada se disolvieron en 500 μ l de TFA al 0,1%, se centrifugaron y se inyectaron en una RP-HPLC con una columna Vydac C₁₈ (0,46 x 25 cm) (Grace Vydac, Hesperia, Ca). La separación se realizó utilizando un gradiente lineal de acetonitrilo al 20-60% en TFA al 0,1% durante 40 minutos a 1 ml/min. Las fracciones de 1 ml se recuperaron y liofilizaron.

Purificación de las isoformas de la apolipoproteína CIII (apoCIII). Se purificó la apoCIII a partir del suero humano mediante absorción en una emulsión lipídica y deslipidación, seguido por cromatografía de las proteínas asociadas a lípidos bajo condiciones de desnaturalización en cloruro de guanidinio y urea, respectivamente, tal como se ha descrito anteriormente (6). Las isoformas de apoCIII se dializaron contra bicarbonato amónico, liofilizándose antes de utilizarlas.

Mediciones de $[Ca^{2+}]_i$. Células, unidas a cubreobjetos, se pretrataron con los distintos compuestos, tal como se describe en los resultados, incubándose entonces en medio basal con 2 μ M de fura-2AM (Molecular probes, Eugene, OR), durante 30 minutos. Los cubreobjetos se montaron como el fondo de una cámara abierta, y las células se perfundieron con medio. Mediante un sistema SPEX Fluorolog-2 conectado a un microscopio de epifluorescencia invertido Zeiss Axiovert, se realizaron grabaciones de señales de fluorescencia. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 340/380 y 510 nm, respectivamente. Los resultados se presentan como proporciones de excitación de 340/380, representativas directamente de $[Ca^{2+}]_i$ (7).

Pinzamiento zonal de membrana. Se grabaron las corrientes celulares totales de Ca^{2+} utilizando la variante perforada zonalmente perforada de la técnica de grabación del pinzamiento zonal de membrana de la célula en su totalidad, para eliminar la pérdida de componentes citoplásmicos solubles. Los electrodos se rellenaron con (en mM): 76 $CaSO_4$, 1 $MgCl_2$, 10 KCl, 10 NaCl, y 5 HEPES (pH 7,35), así como con anfotericina B (0,24 mg/ml) para permeabilizar la membrana celular y permitir un acceso eléctrico de baja resistencia sin romper la zona. Las células β pancreáticas se incubaron en medio RPMI 1640 con apoCIII (10: g/ml) o con vehículo, durante la noche. Las células se bañaron en una solución que contenía (en mM): 138 NaCl, 10 cloruro de tetraetilamonio, 10 $CaCl_2$, 5,6 KCl, 1,2 $MgCl_2$, 5 HEPES y 3 D-glucosa (pH 7,4). Las corrientes celulares totales inducidas por pulsaciones del voltaje (desde un potencial de mantenimiento de -70 mV a diversos potenciales de pinzamiento, desde -60 a 50 mV en incrementos de 10 mV, 100 ms, 0,5 Hz), se filtraron a 1 kHz y se guardaron. Todas las grabaciones se llevaron a cabo con un amplificador Axopatch 200 (Axon Instruments, Foster City, California), a temperatura ambiente (de aproximadamente 22°C). La adquisición y análisis de los datos se realizaron utilizando el programa de software pCLAMP6 (Axon Instruments, Foster City, California).

Caracterización de las proteínas. La secuencia primaria se obtuvo en los secuenciadores ABI 494 y cLC. Los pesos moleculares de las proteínas se determinaron mediante espectrometría de masas por electropulverización (espectrómetro de masas AutoSpec de tándem híbrido, Micromass). Para el registro de los espectros ES convencionales ion-positivos, las muestras (16 pmol/ml) se introdujeron en la interfaz ES mediante infusión o inyección en bucle a una velocidad de flujo de 3 ml/min. Para determinar la posición de la glicosilación, la proteína nativa se sometió a digestión con tripsina 1:10 peso/peso (Promega, Madison, WI). Los fragmentos resultantes se separaron mediante HPLC utilizando una columna Vydac C_8 (2,1 x 150 mm) y un gradiente de 0 a 50% B en 50 minutos (tampón A, acetonitrilo al 5%/TFA al 0,1%; B, acetonitrilo al 80%/TFA al 0,1%). Los fragmentos separados se aplicaron al análisis de la masa.

Cuantificación de apoCIII. Se recogieron los sueros y se prepararon tal como se ha descrito anteriormente. Las cantidades relativas de apoCIII en el suero T1D y en el de control, respectivamente, se evaluaron comparando las áreas máximas que corresponden a apoCIII en la segunda RP-HPLC.

Análisis de citometría de flujo, de la muerte celular. Se cultivaron las células RINm5F, durante 36 horas, en presencia de suero de control al 10%, suero de control y 40 μ g/ml de apoCIII o suero T1D con o sin 100 ó 200 μ g/ml de anti-apoCIII. Se recuperó la población celular completa y se realizó tinción con Anexina V conjugada con EGFP y yoduro de propidio (PI) (BD PharMingen), analizándose en un escaneador FAC utilizando el programa de adquisición CELLQuest (Becton Dickinson, Immunocytometry System). El sistema de compuerta FACS, que se basa en la dispersión hacia delante y lateral, se utilizó para excluir restos celulares y la autofluorescencia, seleccionándose típicamente 10.000 células para análisis.

Análisis estadístico. La significación estadística se evaluó mediante la prueba t de Student, y los valores *P* inferiores a 0,05 se consideraron significativos. Los datos se expresan como promedios \pm SEM.

Resultados y consideraciones

La ApoCIII ejerce un papel clave en la regulación del metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL) (8). Controla el metabolismo de TRL inhibiendo la actividad de la lipoproteinlipasa (LPL) (9,10), induciendo de esta forma hipertrigliciridemia. ApoCIII inhibe asimismo la unión de lipoproteínas restantes a receptores catabólicos como el receptor LDL relacionado a la proteína (LRP) (11). Cuando el gen apoCIII se alteró en ratones con genes inactivados, produciéndose una reducción del 70% en los niveles de triglicéridos (12). La sobreexpresión del apoCIII humano en los ratones transgénicos da lugar a la hipertrigliciridemia (13). La ApoCIII es un polipéptido de 8,8 kDa y 79 residuos (14), con tres isoformas conocidas que difieren en el grado de glicosilación, CIII₀ (sin ácido siálico), CIII₁ (un residuo de ácido siálico), CIII₂ (2 residuos de ácido siálico), que contribuyen aproximadamente al 10%, 55% y 35%, respectivamente, del apoCIII plasmático total (15). La mutagénesis del sitio de glicosilación y la expresión en progenies celulares estables sugieren que la glicosilación intracelular no es necesaria para las funciones de transporte y secreción (16). La falta de glicosilación no afecta a la afinidad de apoCIII por VLDL y HDL (16). La insulina está implicada en la regulación del gen apoCIII e induce una regulación, a la baja y dependiente de la dosis, de la actividad transcripcional. La superexpresión del gen apoCIII podría contribuir a la hipertrigliciridemia apreciada en los pacientes T1D (17). Sin embargo, los ratones transgénicos para el gen humano apoCIII ni son resistentes a la insulina ni hiperinsulinémicos (18). La concentración de apoCIII se encontró previamente que era superior en los pacientes diabéticos que en los individuos normales (19-27). En ratas deficientes en insulina no existió un cambio

significativo en apoCIII en un estudio (28), mientras que otros han informado de un aumento en las proporciones del apoCIII sialilizado (29, 30).

Se han sometido a ensayo sueros de siete pacientes que fueron diagnosticados nuevamente T1D (tabla 1). Las células pancreáticas β de los ratones se cultivaron por la noche con el 10% de los sueros de los pacientes o de los individuos normales. Los sueros de cinco de los pacientes indujeron un aumento significativamente más alto en $[Ca^{2+}]_i$, cuando las células se despolarizaron con 25 mM KCl, llevando a la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L de compuertas del voltaje, que los sueros de los donantes de sangre sanos (Fig. 1). Los sueros positivos se juntaron, concentraron y fraccionaron mediante (RP)-HPLC de fase inversa. Cuando las fracciones se ensayaron en las células β pancreáticas aisladas de los ratones, una fracción (Nº 3, Fig. 2A), que eluía entre 52-60% de acetonitrilo, indujo un aumento más pronunciado en $[Ca^{2+}]_i$, cuando las células se despolarizaron con altas concentraciones de K^+ . Después de otra purificación del componente (o componentes) en esta fracción mediante repetidos procesamientos de RP-HPLC (Fig. 2B, D), todas las fracciones obtenidas se ensayaron en cuanto a efectos sobre el $[Ca^{2+}]_i$, mediante incubación con células β de ratón, por la noche. Los resultados de esta segunda purificación (Fig. 2B) mostraron una actividad más alta en la fracción 2 (Fig. 2C). Se determinó la proteína que indujo un aumento en $[Ca^{2+}]_i$, indicado por la línea en la Fig. 2D. La información secuencial se obtuvo tanto mediante las degradaciones C-terminales como las N-terminales. Las secuencias fueron idénticas a las de la apoCIII humana para los residuos 20 N-terminales y 5C-terminales.

Tabla 1. Caracterización de los pacientes T1D. El género de los pacientes se designa como F, femenino y M, masculino. La presencia, (Pos), ausencia (Neg), o los datos que no están disponibles, (ND), de los anticuerpos para las células de los islotes (ICA), GAD y tirosin fosfatasa IA2 (IA-2), están marcados en la tabla. Los donantes de sangre, sanos, todos negativos para ICA, GAD y IA-2, sirvieron como fuentes de sueros de control. La única medicación administrada fue la insulina.

Paciente	Sexo	Edad (años)	Duración de T1D (semanas)	Medicación	ICA	GAD	IA-2
1	M	32	<1	No*	Pos	Pos	Pos
2	F	32	12	No*	Neg	Pos	Neg
3	F	31	<1	No*	Pos	Pos	Pos
4	F	23	<1	No*	Pos	Neg	ND
5	M	19	<1	No*	Neg	Neg	Pos
6	F	35	<1	No*	Pos	Pos	Pos
7	F	33	28	No*	Pos	Pos	ND

Se analizó la apoCIII purificada de los sueros T1D mediante espectrometría de masas para la identificación de los subcomponentes. Los componentes importantes presentaban masas aparentes de 9423 y 9714 Da (Fig. 2E), que correspondían a las formas mono- y diglicosiladas de apoCIII (los valores teóricos calculados fueron: CIII₀ 8764 Da, CIII₁ 9420 Da, CIII₂ 9712 Da). Para determinar las posiciones de glicosilación, la proteína se sometió a digestión con tripsina y los fragmentos se separaron mediante RP-HPLC. Cuando los fragmentos separados se analizaron mediante espectrometría de masas, siete de los ocho fragmentos mostraron masas idénticas a los valores teóricos. La diferencia de masa se localizó en el fragmento C-terminal, que se había mostrado previamente estar glicosilado (31). La ausencia de un fragmento C-terminal no glicosilado indicaba que las formas apoCIII aisladas estaban glicosiladas. Las cantidades relativas de apoCIII en los sueros T1D y de control, se evaluaron comparando las áreas máximas correspondientes a apoCIII en la segunda RP-HPLC (Fig. 3A). En los sueros T1D, los niveles de las isoformas sialilizadas de apoCIII (apoCIII₁ y apoCIII₂) fueron cuatro veces más altos que en los sueros no diabéticos. La isoforma no sialilizada (apoCIII₀) no se pudo detectar.

Se ha informado de que la concentración de apoCIII se encuentra entre 6 y 14 mg/dl en los individuos de control y entre 9 y 27 mg/dl en los diabéticos (19, 20, 24-27). Estas variaciones pueden, hasta cierto grado, reflejar el hecho de que se han utilizado varios procedimientos para las determinaciones. En los presentes experimentos, se utilizó suero T1D al 10% en el medio de cultivo, en vez del suero fetal de ternera que se emplea habitualmente, por lo que seleccionamos entonces utilizar concentraciones del orden de 10-50 μ g/ml. Se han ensayado concentraciones entre 1 a 50 μ g/ml, y con 1,3 y 6 μ g/ml no se apreció ningún efecto, pero con las concentraciones 10-50 μ g/ml se obtuvieron respuestas.

ApoCIII (Sigma) disponible comercialmente, que constituye una mezcla de apoCIII₁, y apoCIII₂, se ensayó a una concentración de 10 μ g/ml y mostró estimular el flujo de Ca^{2+} , como el producto aislado de los sueros T1D (Fig. 3B). La coincubación de las células β con 100 μ g/ml de un anticuerpo policlonal contra el apoCIII humano (Academy BioMedical Company, Houston, TX), bloqueó la actividad de tanto el apoCIII comercial como la del suero T1D (Fig. 3B, C). El anticuerpo policlonal no presentaba actividad por sí mismo (datos no representados). Cuando se ensayan las tres isoformas de apoCIII mediante incubación de las células β a una concentración de 10 μ g/ml, tanto la isoforma glicosilada (CIII₁ y CIII₂) como la no-glicosilada, se produce un aumento significativamente más alto en $[Ca^{2+}]_i$ que las células que se habían incubado con sólo el vehículo, ácido trifluoroacético (TFA) (Fig. 3D). Para

estudiar el efecto de la posible unión de apoCIII a las lipoproteínas séricas en el medio de cultivo, las células se incubaron en tampón basal que no contenía suero y 10 µg/ml de apoCIII, durante 2 y 6 horas. Se produjo una elevación significativamente intensa en el $[Ca^{2+}]_i$ después de la despolarización, en todos los experimentos en los que las células se habían expuesto a apoCIII, durante 6 horas, pero sólo en uno de tres experimentos en los que el tiempo de incubación era sólo de 2 horas (datos no representados).

Existió un porcentaje más alto de células muertas en la población celular expuesta al suero T1D. Este efecto se previno añadiendo anti-apoCIII (Fig. 3E). Además, la adición de apoCIII puro al medio de cultivo con el suero de control, dio lugar a un aumento en las muertes celulares.

Para dilucidar el mecanismo molecular que subyace al efecto estimulador de apoCIII sobre $[Ca^{2+}]_i$, se analizó la actividad de los canales de Ca^{2+} compuertas del voltaje en células β incubadas con 10 µg/ml de apoCIII. Las células tratadas con apoCIII mostraron corrientes de canales de calcio Ca^{2+} más intensas que las células de control durante las despolarizaciones, del orden de -10 a 10 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -70 mV (Fig. 4A, B). Estos datos demuestran que apoCIII moduló la actividad de los canales de Ca^{2+} de tipo-L, compuertas de voltaje y que el efecto tuvo lugar en el ámbito de las despolarizaciones fisiológicas. Los experimentos de inmunotransferencia no han revelado una interacción directa de apoCIII con los canales de calcio Ca^{2+} (datos no representados). Experimentos futuros clarificarán hasta qué grado esto refleja la imperfección en el protocolo de inmunoprecipitación o la situación actual verdadera.

El presente estudio muestra que las formas sialilizadas de apoCIII eran, como promedio, cuatro veces superiores en los sueros procedentes de los pacientes T1D recientemente diagnosticados, que en los sueros provenientes de los individuos sanos. ApoCIII indujo tanto un aumento en $[Ca^{2+}]_i$ como la muerte en células β . El mecanismo molecular que subyace al efecto estimulador del apoCIII sobre $[Ca^{2+}]_i$, reflejó una activación de los canales de Ca^{2+} de tipo-L compuertas del voltaje. La adición de un anticuerpo contra apoCIII, bloqueó los efectos de tanto el suero T1D como de apoCIII sobre $[Ca^{2+}]_i$, así como también sobre la muerte de las células β . Esto sugiere que el efecto citotóxico dependiente de Ca^{2+} del suero T1D, sobre las células β , pancreáticas, es mediado por apoCIII.

Referencias citadas

1. Efendic, S., Kindmark, H. & Berggren, P. O. (1991) *J Intern Med Suppl* 735,9-22.
2. Juntti-Berggren, L., Larsson, O., Rorsman, P., Ammala, C., Bokvist, K., Wahlander, K., Nicotera, P., Dypbukt, J., Orrenius, S., Hallberg, A. & Berggren, P. O. (1993) *Science* 261, 86-90.
3. Hellman, B. (1965) *Ann N Y Acad Sci* 131, 541-58.
4. Nilsson, T., Arkhammar, P., Hallberg, A., Hellman, B. & Berggren, P. O. (1987) *Biochem J* 248, 329-36.
5. Lernmark, A. (1974) *Diabetologia* 10, 431-8.
6. Bengtsson-Olivecrona, G. & Olivecrona, T. (1991) *Methods Enzymol* 197, 345-56.
7. Kindmark, H., Kohler, M., Efendic, S., Rorsman, P., Larsson, O. & Berggren, P. O. (1992) *FEBS Lett* 303, 85-90.
8. Fredenrich, A. (1998) *Diabetes Metab* 24, 490-5.
9. Krauss, R. M., Herbert, P. N., Levy, R. I. & Fredrickson, D. S. (1973) *Circ Res* 33, 403-11.
10. Ginsberg, H. N., Le, N. A., Goldberg, I. J., Gibson, J. C., Rubinstein, A., Wang-Iverson, P., Norum, R. & Brown, W. V. (1986) *J Clin Invest* 78, 1287-95.
11. Kowal, R. C., Herz, J., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1990) *J Biol Chem* 265, 10771-9.
12. Maeda, N., Li, H., Lee, D., Oliver, P., Quarfordt, S. H. & Osada, J. (1994) *J Biol Chem* 269, 23610-6.
13. Ito, Y., Azrolan, N., O'Connell, A., Walsh, A. & Breslow, J. L. (1990) *Science* 249, 790-3.
14. Brewer, H. B., Jr., Shulman, R., Herbert, P., Ronan, R. & Wehrly, K. (1974) *J Biol Chem* 249, 4975-84.
15. Kashyap, M. L., Srivastava, L. S., Hynd, B. A., Gartside, P. S. & Perisutti, G. (1981) *J Lipid Res* 22, 800-10.
16. Roghani, A. & Zannis, V. I. (1988) *J Biol Chem* 263, 17925-32.
17. Chen, M., Breslow, J. L., Li, W. & Leff, T. (1994) *J Lipid Res* 35, 1918-24.

18. Reaven, G. M., Mondon, C. E., Chen, Y. D. & Breslow, J. L. (1994) J Lipid Res 35, 820-4.
- 5 19. Briones, E. R., Mao, S. J., Palumbo, P. J., O'Fallon, W. M., Chenoweth, W. & Kottke, B. A. (1984) Metabolism 33, 42-9.
20. Joven, J., Vilella, E., Costa, B., Turner, P. R., Richart, C. & Masana, L. (1989) Clin Chem 35, 813-6.
- 10 21. Stewart, M. W., Laker, M. F. & Alberti, K. G. (1994) J Intern Med Suppl 736, 41-6.
22. Bren, N. D., Rastogi, A. & Kottke, B. A. (1993) Mayo Clin Proc 68, 657-64.
23. Nestel, P. J. & Fidge, N. H. (1982) Adv Lipid Res 19, 55-83.
- 15 24. Blackett, P., Sarale, D. C., Fesmire, J., Harmon, J., Weech, P. & Alaupovic, P. (1988) South Med J 81, 469-73.
25. al Muhtaseb, N., al Yousuf, A. & Bajaj, J. S. (1992) Pediatrics 89, 936-41.
- 20 26. Manzato, E., Zambon, A., Lapolla, A., Zambon, S., Braghetto, L., Crepaldi, G. & Fedele, D. (1993) Diabetes Care 16, 469-75.
27. Reverter, J. L., Senti, M., Rubies-Prat, J., Lucas, A., Salinas, I., Pizarro, E., Pedro-Botet, J. & Sanmarti, A. (1993) Clin Chim Acta 223, 113-20.

25 **Listado de secuencias**

- <110> Berggren, Per olof Biostratum, Inc.
- <120> ApoCIII y tratamiento y diagnóstico de la diabetes
- 30 <130> 03-390-PCT
- <150> US 60/466,517
- 35 <151> 2003-04-29
- <160> 8
- <170> PatentIn version 3.1
- 40 <210> 1
- <211> 487
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 45 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(300)
- <223>
- 50 <400> 1

ES 2 398 110 T3

atg cag ccc cgg gta ctc ctt gtt gtt gcc ctc ctg gcg ctc ctg gcc 48
 Met Gln Pro Arg Val Leu Leu Val Val Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15

tct gcc cga gct tca gag gcc gag gat gcc tcc ctt ctc agc ttc atg 96
 Ser Ala Arg Ala Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met
 20 25 30

cag ggt tac atg aag cac gcc acc aag acc gcc aag gat gca ctg agc 144
 Gln Gly Tyr Met Lys His Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu Ser
 35 40 45

agc gtg cag gag tcc cag gtg gcc cag cag gcc agg ggc tgg gtg acc 192
 Ser Val Gln Glu Ser Gln Val Ala Gln Gln Ala Arg Gly Trp Val Thr
 50 55 60

gat gcc ttc agt tcc ctg aaa gac tac tgg agc acc gtt aag gac aag 240
 Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys Asp Lys
 65 70 75 80

ttc tct gag ttc tgg gat ttg gac cct gag gtc aga cca act tca gcc 288
 Phe Ser Glu Phe Trp Asp Leu Asp Pro Glu Val Arg Pro Thr Ser Ala
 85 90 95

gtg gct gcc tga gacctcaata cccaagtcc acctgcctat ccatcctgcc 340
 Val Ala Ala

agctccttgg gtcttgcaat ctccagggt gccctgtag gttgcttaa agggacagta 400

ttctcagtgc tctcctacc cacctcatgc ctggccccc tccaggcatg ctggcctccc 460

aataaagctg gacaagaagc tgctatg 487

<210> 2
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2
 Met Gln Pro Arg Val Leu Leu Val Val Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ser Ala Arg Ala Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met
 20 25 30

Gln Gly Tyr Met Lys His Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu Ser
 35 40 45

Ser Val Gln Glu Ser Gln Val Ala Gln Gln Ala Arg Gly Trp Val Thr
 50 55 60

Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys Asp Lys
 65 70 75 80

Phe Ser Glu Phe Trp Asp Leu Asp Pro Glu Val Arg Pro Thr Ser Ala
 85 90 95

Val Ala Ala

10

<210> 3
 <211> 2509
 <212> ADN
 <213> Rattus norvegicus

15

<400> 3

ES 2 398 110 T3

taaagagacg gatgacctac agccccaggc ccacccattc aacaggccta gctcattccc 60
 aagcccagac atcaaggcat gggacacca cgcatggcag cttcgtgtcc agctttatta 120
 gggacagcat gtttaggtga ggtctgggga gggataaagg catgagaata tactttcccc 180
 ttagagcaac cttcggaggc agcaggatag atggccagac acatctggaa catggaggtc 240
 tcacggctca agagtgggtg ttgttagttg gtcctcaggg ccagactccc agaggccagt 300
 gaacttatca gtgaacttgc tccagtagcc tttcagggat ttgaagcgat tgtccatcca 360
 gccctgggg gttaaaacag taataggtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 420
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gaaaagatct cctgtgggca gctagacca ggggtgcacc 480
 taggcctcca ctggctccc aagccaccag caccacctta cctagacca ccctcagaat 540
 cacctgcagc taccactcaa ggtggaggag atggtaaagg ctaagaaaac ccaccttcat 600
 cagagcccca ttacctcccg tccaatctct cttcaggcct gaggcaccaa ccaactgggga 660
 ggtggatact aaggtcagct tgcctttgta gtccatagaa acagtgtcct tgagggtgcc 720
 catccctggc tctaagtgga tggatcaagg gaggggtgaa ctttctgttt ggaaacatta 780
 ccagagggct tctaagctct gtgatctagg ccaggttatc taactctttc ccagctgagg 840
 aggtagatag tacctctcca caacctgttc tgggcacaga gactgtcaac atcttttgct 900
 acataggcaa tgatcaaatg tcacgtaaac gattggcagg gtaatgtttc atcacgggca 960
 agatgcctca cttaggttga gccCagggat ggaacaggg cagaaccccc aaccgtaat 1020
 gctcaacctt ccaacttccc tgtaatcaga gcaggaaggc ctcccagagc acaccctaga 1080
 ccctgtgctc aaagaagaaa acctgcaggg aggctgaacg ctcctcaggc tgctctgagg 1140
 agaagcagag gagatagaag aagtctgtct gcaactgcctg tcatcttagt cacagtcccc 1200
 agcaaaggcc ccgtgagaga ctggatgctc agacgggccc aagaccctgg taaacttggg 1260
 gggccacagt ctccgtgtcc agggcctcag caccagggca ggaggggca ggaccaggaa 1320
 aggaggctcg tgtgcatacc tggccaccac agctatatca gactcctgca tgctgcttag 1380
 tgcacctcgg accgtcttgg aggcctgttc catgtagccc tgcataagagc ccagcagcaa 1440
 ggatccctct ccctcatcag ctctgcaag agagcagagt tgagccaggc cagccctcag 1500
 ctcttgccca gccatcgctt ttcagggtag ggtccccaga ccagctcccg cagaaatccc 1560
 agccccactt ccaccagctt acgggcagag gccaggagag ccacgagggc cacgatgagg 1620
 agcattcggg gctgcatggc acctgtgcac ctgcgggaga ccactttgtg agagggtatt 1680
 gtggatctcc acatctaagc ctttccctgg agaaccaccac ggccccctctg tcatgaatcc 1740
 ccaagccttt ctctactga tatcagctct cggagagaga actaagaaga cccagaccca 1800
 cccaagggg ctggaagggtg gaatgtggga atcctctgca aagcagaaca tctaccagc 1860
 ctctgcccc aatatggag aaacaacagg tttctttttc tctctaggct tcaggctttt 1920
 cagtctgggg taggcacgga tatcaaggc ttctaatagc tcagagcaag acgaacaagg 1980
 ggcagcatga cccagtccc aatcagctct gccactacc agtgcaaggc tttttgccc 2040
 agtggcctcc ctttctcag cttctagcct cccccacca ccaggatacc caagggtggt 2100
 aggccgtgaa ttccaagcat tctgtaggct agctggctga gtggccagag cgtcttctct 2160
 ctgtctctc cctcccttc tctctcccc aggggcatta cctggagtag ctagctgctt 2220
 ctagggataa aactgggcag gcaagccggg acgctctgat ctgttttata ttggctccag 2280
 gatgggacag cgggcacaga agggccagt agctgggtcaa aggtcacctg ctgaacagtc 2340
 cagaccagag cccgaggcag ggaggccatg cagccagctg ccagaggagt tgagaaatcc 2400
 ctcaagatt gccacaccg ttcacttcca ctctccagc caagagatca gctactgacc 2460
 tgcctcagtg agactgggtga gacaggaaaa gactcagggg acaagcctt 2509

<210> 4
<211> 101

ES 2 398 110 T3

<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 4
Met Gln Pro Arg Met Leu Leu Ile Val Ala Leu Val Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ser Ala Arg Ala Asp Glu Gly Glu Gly Ser Leu Leu Leu Gly Ser Met
20 25 30
5 Gln Gly Tyr Met Glu Gln Ala Ser Lys Thr Val Gln Asp Ala Leu Ser
35 40 45
Ser Met Gln Glu Ser Asp Ile Ala Val Val Ala Ser Arg Gly Trp Met
50 55 60
Asp Asn Arg Phe Lys Ser Leu Lys Gly Tyr Trp Ser Lys Phe Thr Asp
65 70 75 80
Lys Phe Thr Gly Leu Trp Glu Ser Gly Pro Glu Asp Gln Leu Thr Thr
85 90 95
Pro Thr Leu Glu Pro
100

<210> 5
<211> 3262
<212> ADN
10 <213> Macaca fascicularis

<220>
<221> CDS
<222> (858)..(912)
15 <223>

<220>
<221> CDS
<222> (1048)..(1171)
20 <223>

<220>
<221> CDS
<222> (2871)..(2988)
25 <223>

<400> 5
ctgcagggct ggcgggacag cagcatggac acagtctcct ggggatttcc caactctccc 60
gccagcttgc tgcctctggc cgccctgcct caggccctgg tctctgatca gcaggtgacc 120
tttggcccagt gccctgggtc ctcagtgcct gctgccctgg agacaatata aaacaggctc 180
agaacctcc tgcctgcctg cctctgttcat ccctagaggc agctgctcca ggtaatgccc 240
tctggggagg ggaagaggga ggggaggagg atgaagaggga gcaagaggag ctcctgccc 300
agcccagcca gcaagcctgg agaaacctt gctagagcta aggaagcctc ggagctggac 360
gggtgcccc aacctctcat cataacctga agaaaatgga ggcccgggag ggggtgctact 420
tgcccaaagc tacacagggg gtggggctgg aatggttcc aagtgcaggc ttccccgtca 480
ttctgcaggc ttagggctgg aggaagcctt agacagccca gtcctacca gacagggaaa 540
ctgaggcctg gagagggcca gaaagccca aagtcacaca gcatgttggc tgcactggac 600
agagaccagt ccagaccgca ggtgccttga tgtccagtct ggtgggtttt ctgctccatc 660
ccacctacct cccttgggc ccctcactag tccccttctg agagcccgta ttagcaggaa 720
gcaggccctt actccctctg gcagaccgag ctcaggctcc accttagggg ccatgccacc 780
tgtccagggg ggggtccaga ggcattgggg cctgggggtg ccctcacagg acaattcctt 840

ES 2 398 110 T3

gcaggaacag aggcgcc atg cag ccc cgg gta ctc ctt gtt gct gcc ctg 890
Met Gln Pro Arg Val Leu Leu Val Ala Ala Leu
1 5 10

ctg tca ctc ctg gcc tct gcc a gtaagcactt ggtgggactg ggctgggggc 942
Leu Ser Leu Leu Ala Ser Ala
15

aggatggagg tggcttgggg atcccagtc taatgggtgg tcaagcagga gctcagggt 1002

cgcttagagg ccgatccacc actctcagcc ctgctctttc ctgag ga gct tca gag 1058
Arg Ala Ser Glu
20

gcc gag gac acc tcc ctt ctt ggc ttc atg cag ggc tac atg cag cat 1106
Ala Glu Asp Thr Ser Leu Leu Gly Phe Met Gln Gly Tyr Met Gln His
25 30 35

gcc acc aag acc gcc aag gat gca ctg acc agc gtc cag gag tcc cag 1154
Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu Thr Ser Val Gln Glu Ser Gln
40 45 50

gtg gcc cag cag gcc ag gtacaccgc tggcctccct cccatccct 1201
Val Ala Gln Gln Ala Arg
55

catgccagct cctccattc ccaccgccc tgccctggtg agatcccagc aatggaatgg 1261

aggtgccagc ctcccctggt cctgtgcctc tttggcctcc tctttctca cagggccttg 1321

gtcaggctgc tgtgggagag acgacagagt tgagactgcg tccccccgg gtcctcctt 1381

tctcccagag cagttctagg gtgggccatt ttagccctca tttccatttt cctttcctt 1441

tctttctttt tcttttcttt ttttttcttt ctttcttttt tttttttgag atggagtctc 1501

cctctgtcac ccaggctaga gtgcagtggg gcgatctcag cggatctcgg ctactgcaa 1561

cctctgcctc ccaggctcac ccattctcc tgcctcagcc tccaagtag ctgggattac 1621

aggcgtgcca ccacatccag ctactttttg tatttttctc agagacgggg tttcccatg 1681

ttggacaggc tggcttgaa ctctgacct caggatgatc gcctacctcg gcctcccaa 1741

ttgctgggat tacaggcatg agccactgcg cctgaccca ttttctttt ctgaaggctc 1801

ggctagagca gaggtcctca acctttttgg caccaggac cagttttgtg gtagacagtt 1861

tttccatggg tcagcgggga tggcttgggg atgaaactgc tccacctcag atcaccaggc 1921

attggattct cctaagaagc cctccacccc gaccctggc atgcgcagtt cacaacagg 1981

ttcacactcc tgtgagaatc taatgccgcc taacctgaca gaaggcgggg cttgggcgg 2041

attcctctgt caccatcac tcactttgtg ctgtgcagcc tggctcctaa ctggccatgg 2101

accagtacc atctgtgact tgggggctgg ggaccctgg gctaggggtt tgccttggga 2161

ggccccact ggccaattc tagcctgggt atgagagtgc ttctgctttg ttccaagacc 2221

tggggccagg gtgagtagaa gtgtgtcctt cctctcccat cctgcccctg cccatcggtc 2281

ctctctctc cctactccct tccccctc acctgactg gcattggctg gcatagcaga 2341

ggttgtttat aagcattctt aatcctcaga accggctttg gggtaggtgt tttttccca 2401

ctttgcagat gagaaaattg aggcctcagag cgattaggtg acctgcccc gatcacacaa 2461

ES 2 398 110 T3

ctaatacaatc ctccaatgac tttccaaatg agaggctgcc tccctctgtc ctaccctgct 2521
 cggaaccacc aggatataca actccagggg atactgtctg cacagaaaac aatgacagcc 2581
 ttgacctttc acatctcccc accctgtcac tctgtgcctc aagcccaggg gcaaaaacat 2641
 ctgaggtcac ctggagacgg caggggtcga cttgtgctgg ggttcctgta agggcatctc 2701
 ttctcccagg gtggcagctg tgggcagctc tgcctgaggt ctcagggctg ttgtccagtg 2761
 aagttgagag ggtggcaggg agagccagtg gggacatggg tgtgggtccc atagttgcct 2821
 ccaaaggagt tctcatgccc tgctctgttg cttcccctta ctgatttag a ggc tgg 2877
 Gly Trp

gtg acc gat ggc ttc agt tcc ctg aaa gac tac tgg agc acc gtt aag 2925
 Val Thr Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys
 65 70 75

gac aag tta tct ggg ttc tgg gat ttg aac cct gag gcc aaa ccc act 2973
 Asp Lys Leu Ser Gly Phe Trp Asp Leu Asn Pro Glu Ala Lys Pro Thr
 80 85 90

ctg gct gag gct gcc tgagacctca ataccccaag tccacctgcc tgtccatcct 3028
 Leu Ala Glu Ala Ala
 95

gccagctcct tgggtcctgc agcctccagg gctgccctg taggttgctt aaaagggaca 3088
 gtattctcag tgccctccta ccgcacctca tgcctggccc cctccaggc aggggtgtcct 3148
 cccaataaag ctggacaaga agctgctatg agtgggccgt cacaagtgtg ccatctgtgt 3208
 ctgggtatgg gaaagggctc gaggtgttc tgtgggtagg cactggacga ctgc 3262

<210> 6
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis

5

<400> 6
 Met Gln Pro Arg Val Leu Leu Val Ala Ala Leu Leu Ser Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ser Ala Arg Ala Ser Gln Ala Gln Asp Thr Ser Leu Leu Gly Phe Met
 20 25 30
 Gln Gly Tyr Met Gln His Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu Thr
 35 40 45
 Ser Val Gln Gln Ser Gln Val Ala Gln Gln Ala Arg Gly Trp Val Thr
 50 55 60
 Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys Asp Lys
 65 70 75 80

Leu Ser Gly Phe Trp Asp Leu Asn Pro Glu Ala Lys Pro Thr Leu Ala
 85 90 95

10

<210> 7
 <211> 2411
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15

<220>
 <221> CDS
 <222> (54)..(350)
 <223>

20

ES 2 398 110 T3

<400> 7

gctacatcag gggctgtgca gcgctgcccc tactccgagc aaagaactgt ggc cag	56
	Gln 1
agg cag tcg agg tta gtg agg act gcg agg cag aca ctt tgc tgt gtt	104
Arg Gln Ser Arg Leu Val Arg Thr Ala Arg Gln Thr Leu Cys Cys Val	
	5 10 15
caa atc caa gtc aag ggt aca aaa atg cag agc aat aaa gcc ttt aac	152
Gln Ile Gln Val Lys Gly Thr Lys Met Gln Ser Asn Lys Ala Phe Asn	
	20 25 30
ttg gag aag cag aat cat act cca agg aag cat cat cag cat cac cac	200
Leu Glu Lys Gln Asn His Thr Pro Arg Lys His His Gln His His His	
	35 40 45
cag cag cac cat cag cag caa cag cag cag cag cag caa cag cca ccc	248
Gln Gln His His Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro	
	50 55 60 65
cca cca ata cct gca aat ggc cag cag gcc agc agc cag aat gaa ggc	296
Pro Pro Ile Pro Ala Asn Gly Gln Gln Ala Ser Ser Gln Asn Glu Gly	
	70 75 80
ttg act att gac ctg aag aat ttt agg aaa cca gga gag aag acc ttt	344
Leu Thr Ile Asp Leu Lys Asn Phe Arg Lys Pro Gly Glu Lys Thr Phe	
	85 90 95
aca cag cgtagccgtc tctttgtggg caatcttccc cctgatatca ctgaggagga	400
Thr Gln	
aatgaggaaa ctatttgaga aatatggaaa agcaggcgaa gttttcattc ataaggataa	460
aggctttggc tttattcgct tggaacacg aaccctagcg gaaattgtca aagtggagct	520
ggacaacatg cccctccgtg ggaagcagct gcgagtgcgc ttcgcctgtc acagtgcac	580
ccttacagtc cgcaaccttc ctcagtacgt gtcgaacgaa ctgctggaag aagccttttc	640
tgtgttcggc caggtggaga gggctgtagt cattgtggat gaccgaggaa ggccctcagg	700
gaaaggcatt gttgagttct cagggagacc agctgctcgg aaagctctgg acagatgcag	760
tgaaggctcc ttcttgctga ctacatttcc ttggcctgtg actgtggagc ctatggacca	820
gttagatgat gaagagggac ttccagagaa actggttata aaaaaccagc aattccacaa	880
ggagagagaa cagccaccca gattgcaca acctggctcc tttgagtatg agtatgcat	940
gcgctggaag gcactcattg agatggagaa gcaacagcag gatcaagtgg atcggaacat	1000
caaggaggct cgtgagaagc tggagatgga gatqqaqgct gcacgtcatg agcaccaggt	1060

ES 2 398 110 T3

tatgctaatag aggcaggatt tgatgagacg tcaagaagag cttcggagaa tggaggagct 1120
gcataaccaa gaggttcaga agcgaaagca gttagaactc aggcaggaag aggaacgcag 1180
gcgccgtgag gaagagatgc ggcgacaaca agaggaaatg atgcgccgac agcaggaagg 1240
attcaagggga accttccctg atgcgagaga acaagagata cggatgggcc aaatggctat 1300
gggaggtgct atgggcataa acaatagagg gcgcatgccc cctgctcctg tgccacctgg 1360
tactccagct cctccaggac ctgccactat gatgccagat ggaacccttg gattgacccc 1420
accaacaact gaacgttttg gccaaactgc aacaatggaa ggaattggag caattggtgg 1480
aactcctcct gcattcaacc gtccagctcc gggagctgaa tttgctcaa ataaacgccg 1540
ccgatattag ataaagtgc attgtctagt ttcttgacg ccttaaaaga agggcccttt 1600
ttggactagc cagaattcta ccctggaaaa gtgttagggg ttcttcccaa tagataggcc 1660
ttcctgctt gtactactct agggatcatg cttgaagtca gaggggcaga gaaggggtgg 1720
tattcaacaa gtcaaagtct gtggtatatt gctttatcaa gactgtctgg tgcattcctg 1780
aactatatta attggtgagg gcctggagaa ccatgggaaa atgaactcag agctccatta 1840
atcttgatca ttccttctct ctcttctct ctctcttgtt ttaattactt tctcatcttt 1900
attccccca acccctgaga cactgccata tataaccaca accataaaca tcctccaatg 1960
acctagcccc atccctccat tcaactccag gtaagaattc agacaaatgt ccacagaggt 2020
tacagcatac gtacggttgt gttatatctc atatatgacc ccttcatgtc ctaaggaaga 2080
cattttctct tagaggtttt catttttagta tatcttaaaa gaatcttgtg ttaccttgcc 2140
tccatctttt tcttgggtaa ggactacact ttgtgtctct gatgttgctg ttcacagctt 2200
ttcttgatag gcctagtaca atcttgggaa cagggttgct gtgtggtgaa ggtctgacag 2260
tagttcttag tcttgctat cttaggtagc tacgctgtgc atttttattg gtatactatg 2320
aattgttcca gataccttca gtttgaaag ttttctgaga aatggagacg tcatgcggca 2380
tcaccttatt aaaatgcatt tgaagccttt t 2411

<210> 8

<211> 99

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 8

Gln Arg Gln Ser Arg Leu Val Arg Thr Ala Arg Gln Thr Leu Cys Cys
1 5 10 15

Val Gln Ile Gln Val Lys Gly Thr Lys Met Gln Ser Asn Lys Ala Phe
20 25 30

Asn Leu Glu Lys Gln Asn His Thr Pro Arg Lys His His Gln His His
35 40 45

His Gln Gln His His Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro

ES 2 398 110 T3

50

55

60

Pro Pro Pro Ile Pro Ala Asn Gly Gln Gln Ala Ser Ser Gln Asn Glu
65 70 75 80

Gly Leu Thr Ile Asp Leu Lys Asn Phe Arg Lys Pro Gly Glu Lys Thr
85 90 95

Phe Thr Gln

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para identificar compuestos candidatos para el tratamiento de la diabetes tipo I *in vitro*, que comprende el contacto de células β pancreáticas con una cantidad de apolipoproteína CIII ("apoCIII") efectiva para aumentar la concentración de calcio intracelular en presencia de uno o más compuestos de prueba, e identificar aquellos compuestos de prueba que inhiben un aumento inducido por apoCIII en la concentración de calcio intracelular en las células pancreáticas.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la apoCIII comprende apoCIII sialilizada.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la apoCIII está purificada sustancialmente.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la síntesis de los compuestos de prueba que inhiben un aumento inducido por apoCIII en la concentración de calcio intracelular en las células β pancreáticas.
- 20 5. Utilización de un inhibidor de apoCIII, seleccionado de entre el grupo que consiste en un anticuerpo selectivo para apoCIII, un oligonucleótido antisentido dirigido contra el ARNm de apoCIII, y un pequeño ARN de interferencia dirigido contra el ARNm de apoCIII, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes tipo I.
- 25 6. Procedimiento para diagnosticar una propensión a desarrollar la diabetes tipo I en un individuo, que comprende:
- (a) determinar una cantidad de apoCIII sialilizada en una muestra sérica sanguínea de un individuo;
 - 30 (b) comparar la cantidad con una cantidad de apoCIII sialilizada en una muestra sérica sanguínea de control; y
 - (c) diagnosticar aquellos individuos con una cantidad elevada de apoCIII sialilizada en la muestra sérica sanguínea con respecto al control, como que presentan una propensión a desarrollar la diabetes tipo I.
- 35 7. Procedimiento para identificar los pacientes diabéticos que deben ser tratados con una terapia anti-apoCIII, que comprende:
- (a) determinar una cantidad de apoCIII en una muestra sérica sanguínea de un sujeto diabético, y compararla con una muestra sérica sanguínea de control; y
 - 40 (b) identificar aquellos individuos con una cantidad elevada de apoCIII en la muestra sérica sanguínea, con respecto a la muestra sérica sanguínea de control como individuos que deben ser tratados con una terapia anti-apoCIII,
- en el que los individuos que deben ser tratados con la terapia anti-apoCIII, van a ser tratados con un compuesto terapéutico apoCIII, seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo selectivo para apoCIII, un oligonucleótido antisentido dirigido contra el ARNm de apoCIII, y un pequeño ARN de interferencia, dirigido contra el ARNm de apoCIII.

Figura 1

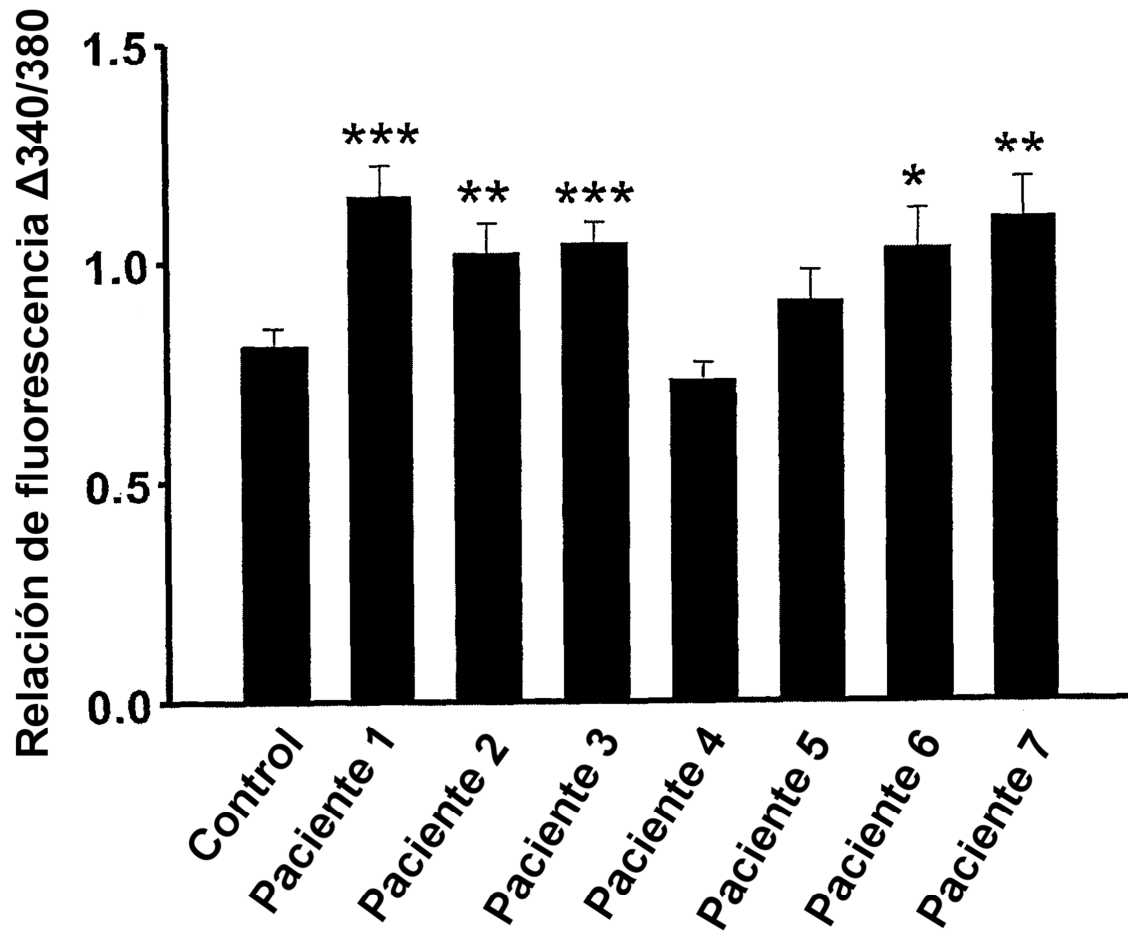


Figura 2

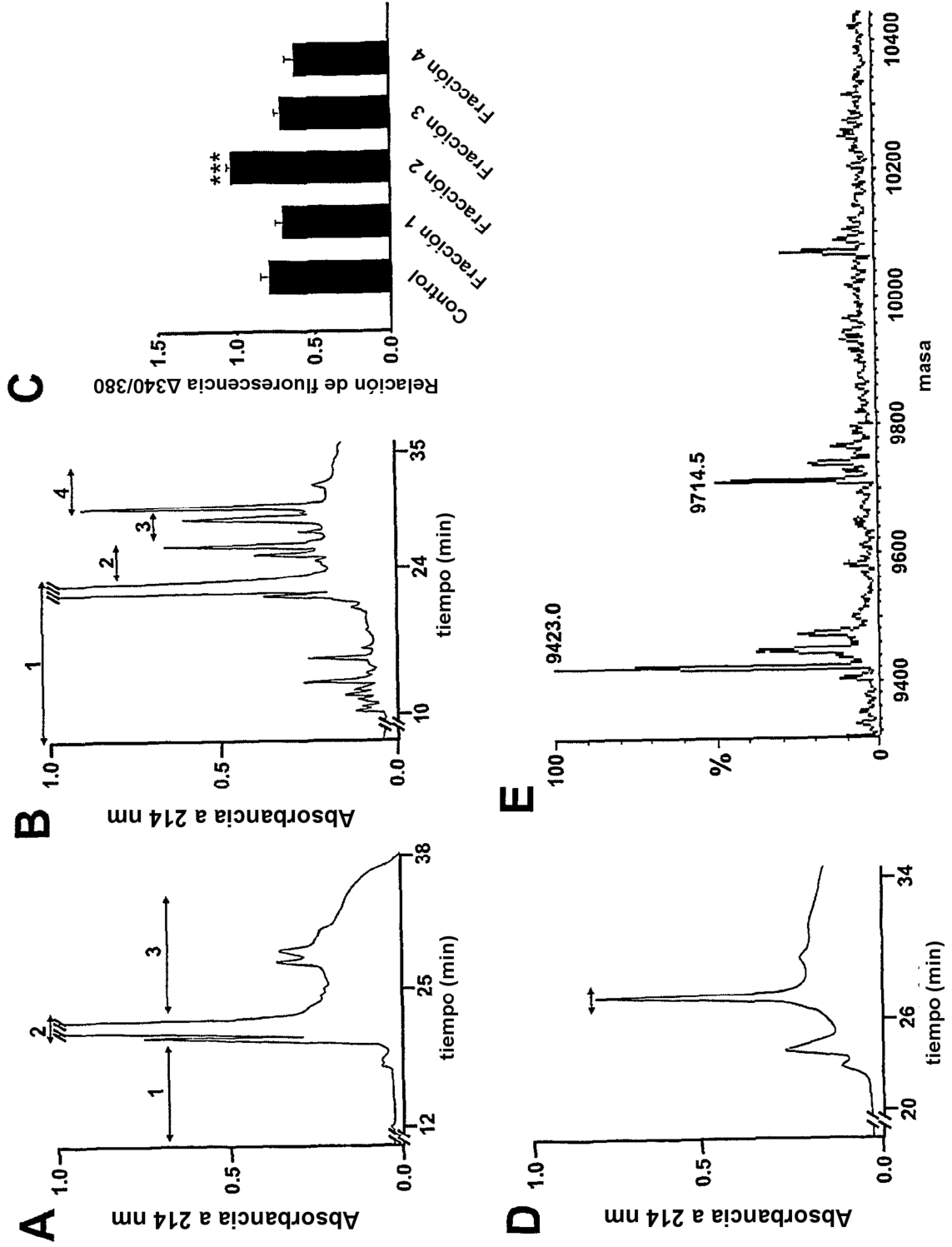


Figura 3

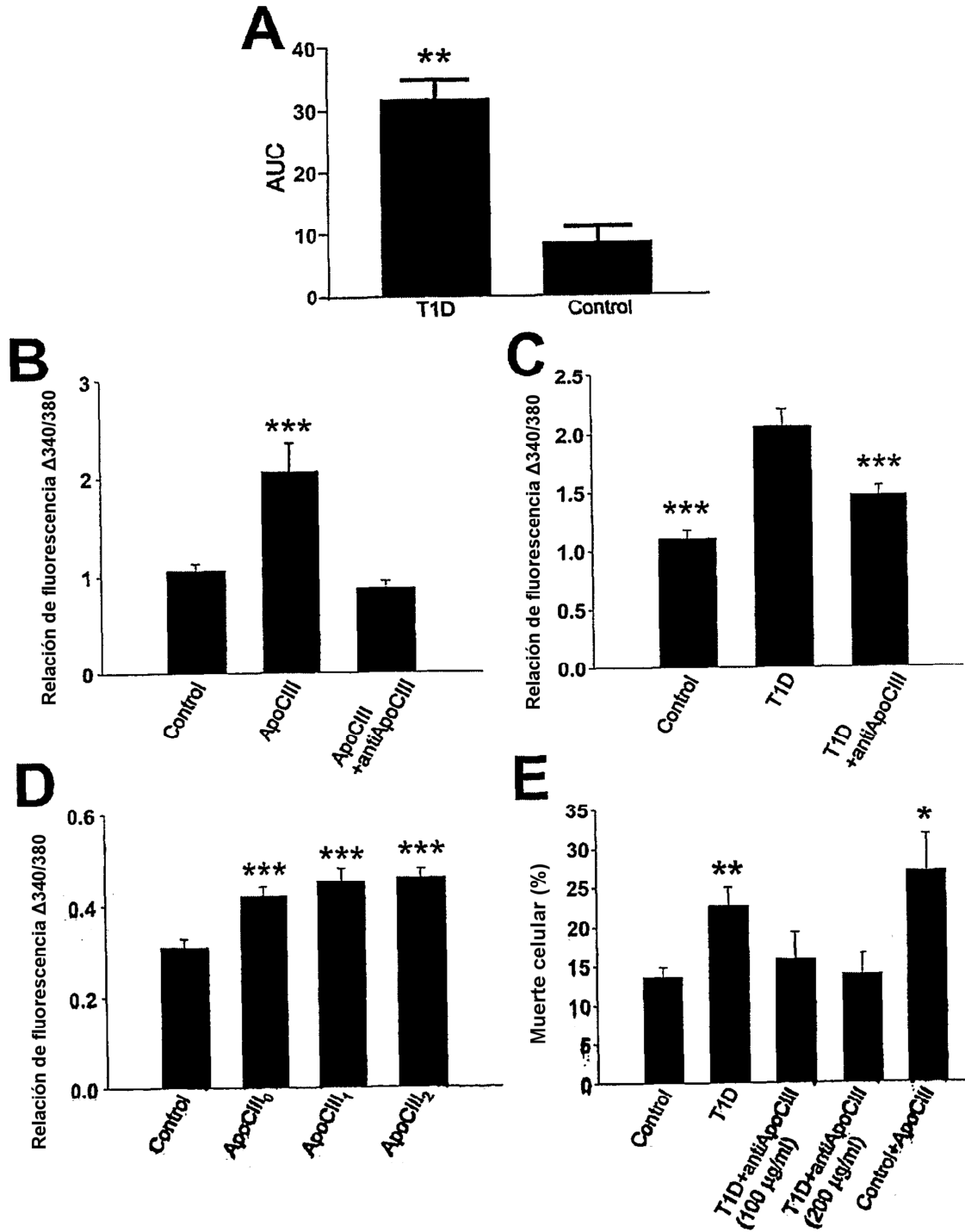


Figura 4

