

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 454 592**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2003 E 10007471 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 2239272**

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

30 Prioridad:

18.11.2002 FR 0214374

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

11.04.2014

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (50.0%)
Bâtiment "Le Ponant D" 25, rue Leblanc
75015 Paris, FR y
UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SEVE, MICHEL y
FAVIER, ALAIN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 454 592 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 beta pancreáticas 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 beta pancreáticas de los islotes de Langerhans, a los polinucleótidos que codifican dicha proteína que está implicada en la maduración y exocitosis de la insulina, así como a sus aplicaciones, en particular para la selección y estudio de células beta, así como para el cribado de medicamentos activos para la diabetes y la hiperinsulinemia.

10 La diabetes es una de las enfermedades más frecuentes, que afecta a 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 insulínoddependiente afecta a aproximadamente 500.000 a 1 millón de individuos en Estados Unidos y a 150.000 en Francia, es decir de 0,2 a 0,4 % de la población. Los síntomas característicos comprenden una tasa elevada de azúcar en la sangre y en la orina, diuresis importante, hambre y sed intensos, así como pérdida de peso.

15 La diabetes de tipo II no insulínoddependiente (DNID), descrita también con el nombre de diabetes "grasa" o diabetes de la madurez, aparece con frecuencia alrededor de los 50 años. 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 son tratados con medicamentos antidiabéticos y/o insulina.

Aunque la diabetes pueda estar controlada por inyecciones de insulina y aportes controlados de glúcidos, las complicaciones asociadas con esta patología hoy en día necesitan nuevos procedimientos para su prevención, tratamiento y diagnóstico.

25 El páncreas comprende dos estructuras tanto morfológica como fisiológicamente distintas:

- el páncreas exocrino que produce las enzimas que intervienen en la digestión (amilasa, lipasa, etc.) y bicarbonato sódico;

30 - el páncreas endocrino que produce las hormonas que intervienen en el control de la glucosa sanguínea (insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático).

35 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 de células: células alfa, beta, delta y células PP. Las células alfa están situadas en la periferia del islote y secretan glucagón. Las células beta se encuentran en el centro del islote y son las únicas células capaces de secretar insulina en respuesta a la glucosa. Las células delta están en la periferia y secretan somatostatina. La función de las células PP es más controvertida (síntesis del polipéptido pancreático).

40 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 célula, frena el estudio de su funcionamiento y por lo tanto el desarrollo de nuevos procedimientos de tratamiento de la diabetes de tipo I y II.

45 Entre los tratamientos de la diabetes, además de la administración regular de insulina, una de las vías de control fisiológico de la glucemia y la normalización de la glucemia en los diabéticos, es el paso por la restauración de la secreción de insulina in vivo a partir de las células. En esta óptica se han propuesto varias soluciones:

50 - la obtención de células productoras de insulina en animales mediante la realización de un xenotrasplante;

- la diferenciación in vitro de células secretoras de insulina a partir de células madre aisladas, con el propósito de reimplantación [1], esto 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, en particular útiles para el fenotipado y la purificación de las células diferenciadas;

60 - el trasplante de islotes pancreáticos; recientemente numerosos trabajos han tenido como objetivo la preparaciones de islotes o de células beta pancreáticas con fines terapéuticos. La primera etapa del trasplante es la extracción del páncreas de un donante en estado de muerte cerebral. El aislamiento de los islotes empieza por una digestión enzimática del páncreas mediante una disolución de colagenasa. Todos los trasplantes no requieren una purificación de los islotes digeridos. Sin embargo, la mayoría de los investigadores hoy están de acuerdo en decir que la purificación de los islotes es necesaria para un alotrasplante [2]. Después los islotes son trasplantados, a razón de una masa suficiente (mínimo 3000 IEQ/kg) por inyección intraportal (IEQ: islote equivalente, *Equivalent Ilôt*).

Sin embargo, el aislamiento de islotes o de células beta pancreáticas necesita medios de selección e identificación de las células beta, específicos y fiables.

Trabajos anteriores han intentado desarrollar procedimientos de marcaje de células beta. Se pueden citar:

- el marcaje por la GFP (proteína verde fluorescente) que permite un marcaje fluorescente de la célula. El inconveniente principal de esta técnica es la necesidad de introducir un gen exógeno o transgén en la célula, y lo que es más, el uso de un vector vírico (adenovirus) [1];

- la técnica basada en la autofluorescencia importante de la célula beta [2]. Pero esta técnica carece de especificidad frente al tipo celular;

- la incubación de células con un fluorocromo específico de cinc: Newport Green [3] o ditizona [4]. Esta técnica se basa en el contenido importante de cinc en 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 técnicas presentan muchos inconvenientes: uso de un producto químico, riesgo de toxicidad frente a la célula beta, carece de especificidad frente al tipo celular. Además, la ditizona tiene un problema de fotodegradación rápida [6];

- poner de manifiesto de forma indirecta por reconocimiento por un clon de linfocitos T (documento WO 91/17186) la presencia de un antígeno expresado por las células beta. Los trabajos iniciales sobre este antígeno no aportaron resultados en términos de caracterización de la secuencia peptídica, así como en términos de la selectividad de la célula beta en relación con los otros tipos de células del islote, y también del páncreas o del organismo. Trabajos más recientes de los mismos autores, muestran una distribución mucho mayor de este antígeno, que, de hecho, no es específico de la célula beta [7];

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

Por consiguiente, existe una falta de marcador específico y fiable de las células beta de los islotes pancreáticos de Langerhans.

Uno de los objetivos del presente estudio es proporcionar dicho marcador.

El islote de Langerhans acumula cantidades muy grandes 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 las células beta pancreáticas, es liberada en el medio extracelular por exocitosis en respuesta a estímulos externos, como un aumento de la concentración de glucosa. Esta elevación de glucosa produce una modificación de la relación de ATP/ADP, el cierre de los canales de potasio y la abertura de los canales de calcio, lo 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 y 6:2, respectivamente. La insulina es almacenada en los gránulos de secreción en forma de un sólido compuesto de hexámeros ligados 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 y también el cinc, a la circulación. El cinc liberado actúa en un bucle de retrocontrol negativo en los canales de potasio, provocando su activación y la detención de la exocitosis.

En las células de mamífero, se han clonado y caracterizado 7 proteínas homólogas que tienen una función de transportador de cinc, llamadas ZnT-1, -2, -3, -4, -5, -6 y -7. El análisis de la estructura primaria de estas proteínas ha permitido definir un patrón estructural común compuesto de 6 dominios transmembranales y de un bucle intracelular rico en histidina. ZnT-1 es un transportador ubicuo, localizado en la membrana plasmática que asegura el flujo de cinc fuera de la célula [11]. ZnT-2 permite a la célula tolerar un exceso de cinc en el medio de cultivo, confiriendo así una resistencia al cinc por una localización de este en las vesículas intracitoplasmáticas ácidas, asegurando así una acumulación de cinc en la célula muy superior a la normal [12]. ZnT-3 y ZnT-4 clonados en el hombre, tienen funciones similares a ZnT-2. ZnT-3 es específica de determinados tejidos y expresada con nivel alto en el cerebro, las membranas de vesículas sinápticas ricas en cinc, las fibras musgosas del hipocampo y los testículos. ZnT-4 es expresada de forma ubicua, pero se encuentran niveles más elevados en el cerebro y las células epiteliales. Este transportador es esencial en el epitelio de mamífero donde participa en el control del contenido de cinc de la leche materna. ZnT-5 y ZnT-6 también son transportadores ubicuos localizados en el aparato de Golgi. ZnT-7 es un transportador ubicuo, localizado específicamente en el retículo endoplásmico de las células.

También se ha descrito un polinucleótido que codifica un polipéptido transportador de cinc llamado NOV2, en la solicitud internacional WO 02/24733. Dicho polipéptido es expresado no solo a nivel del páncreas, sino también de la

médula ósea, cartílago, placenta y riñón. Por consiguiente, debido a su expresión en diferentes tejidos, este polipéptido no se puede usar como marcador específico de células beta pancreáticas.

Trabajos precedentes mencionan un intento de investigación de genes implicados en el metabolismo del cinc en la célula beta pancreática. Estos trabajos no han logrado poner de manifiesto una proteína o un transportador específico [10].

Los autores de la invención han aislado un polinucleótido de 1110 pares de bases (SEQ ID NO: 1) que representa el ADNc que corresponde a un ARNm expresado de forma específica en el islote de Langerhans, y más en particular en la célula secretora de insulina o célula beta.

Este polinucleótido codifica una proteína denominada ZnT-8, (SEQ ID NO: 2), cuya proteína de 369 aminoácidos correspondientes a una masa molecular calculada de 40,8 kDa, presenta una estructura primaria homóloga a la de las proteínas de la familia ZnT. El gen que codifica dicha proteína se denomina *ZnT-8*.

Se ha descrito el uso de un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 para la detección en un sujeto de anticuerpos dirigidos contra este polipéptido, en el marco de un procedimiento de diagnóstico de cáncer de páncreas, 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 transmembranal de la proteína ZnT-8 completa muestra que tiene 6 dominios transmembranales (aminoácidos 74-95, 107-126, 141-163, 177-196, 216-240, 246-267), estando situados los extremos N y C terminales en el citoplasma. Este estudio muestra también 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 insulina, y sobre la membrana plasmática, indica 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 exocitosis de la insulina en las células beta de los islotes pancreáticos de Langerhans.

La proteína ZnT-8 y el polinucleótidos correspondiente constituyen, por primera vez, un marcador específico y fiable de las células beta de los islotes pancreáticos de Langerhans; los usos de estos marcadores son en particular los siguientes:

- selección celular: el marcador permite considerar una selección y una reparación selectiva de 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 se puede usar in vitro para estudiar: (i) el exceso de expresión del transportador (ZnT-8) en líneas celulares modelo (insulinoma de rata INS-1 por ejemplo) y el impacto en la secreción de insulina en respuesta a una estimulación por la glucosa, (ii) la sensibilidad de las células a la muerte celular (apoptosis) inducida por condiciones de estrés oxidante o de concentración baja o alta de cinc, y (iii) las etapas de diferenciación de células madre en células secretoras de insulina en respuesta a diferentes estímulos exógenos (factores de crecimiento, extractos pancreáticos).

- cribado de medicamentos: el marcador representa también un objetivo farmacológico útil para el cribado de sustancias capaces de modular la expresión del gen *ZnT-8* y/o la actividad de la proteína ZnT-8, que se pueden usar potencialmente para el tratamiento de la diabetes y la hiperinsulinemia.

- diagnóstico de diabetes: el polinucleótido también se puede aplicar de forma ventajosa en el diagnóstico precoz de la diabetes en familias con riesgo, en particular, en cuanto que permite detectar mutaciones observables en el gen *ZnT-8* y también reducir o eliminar los exámenes que se llevan a cabo habitualmente.

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

- los polinucleótidos que comprenden o presentan una de las siguientes secuencias: (a) la secuencia SEQ ID NO: 1, (b) un fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 1 de al menos 15 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos, todavía más preferiblemente de 25 a 30 nucleótidos, (c) una secuencia que presenta un porcentaje de identidad de al menos 80% después del alineamiento óptimo con una de las secuencias definidas en (a) o en (b), y (d) una secuencia complementaria, de sentido directo o sentido contrario de una de las secuencias definidas en (a), (b) o (c), y

- las proteínas codificadas por los polinucleótidos como se han definido en (a), (b), (c) o (d) antes, que comprenden o presentan una de las siguientes secuencias: (2) la secuencia SEQ ID NO: 2, (f) un fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 2 de al menos 15 aminoácidos consecutivos, (g) una secuencia que presenta un porcentaje de identidad de al menos 60% después de alineamiento óptimo con una de las secuencias definidas en (e) o en (f), o al menos 65% de similitud, preferiblemente identidad de 80% o al menos similitud de 90%, o de forma todavía más preferida identidad de 90% o al menos similitud de 95%.

El polinucleótido como se ha definido antes, se puede aislar a partir de las células de Langerhans o a partir de bancos de ADN celular, en particular de bancos de ADN de células pancreáticas, muy en particular a partir de un banco de ADN de células pancreáticas humanas. Preferiblemente, las células usadas son células de los islotes de Langerhans.

El polinucleótido como se ha definido antes también se puede obtener por una reacción de polimerización en cadena (PCR) realizada en el ADN total de las células de Langerhans, por RT-PCR realizadas en el ARN total de las células beta de los islotes pancreáticos de Langerhans o por síntesis química.

Por polinucleótido se entiende un encadenamiento preciso de nucleótidos, modificados o no, que constan o no de nucleótidos no naturales. Por lo tanto, este término cubre cualquier secuencia que codifica una proteína ZnT-8 o un fragmento de dicha proteína (ADN genómico, ARNm, ADNc) y también los oligonucleótidos, de sentido directo o sentido contrario, así como los ARN interferentes pequeños (*small interfering RNA*, *siRNA*) 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 designan los ácidos nucleicos o proteínas que presentan, en relación con la secuencia de referencia, determinadas modificaciones como en particular una eliminación, truncado, prolongación, fusión química y/o sustitución, en particular puntual, y cuya secuencia de nucleótidos presenta una identidad de al menos 80% y la secuencia de aminoácidos presenta al menos una identidad de 65% después de 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 designa un porcentaje de nucleótidos o de restos de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias que se comparan, obtenido después del mejor alineamiento, siendo dicho porcentaje puramente estadístico y estando repartidas las diferencias entre las dos secuencias al azar y a lo largo de toda su longitud.

Por "mejor alineamiento" o "alineamiento óptimo" se entiende que se designa el alineamiento por el cual el porcentaje de identidad determinado como se describe a continuación es el más elevado. Las comparaciones entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos tradicionalmente se llevan a cabo: comparando estas secuencias después de haberlas alineado de forma óptima, llevándose a cabo dicha comparación por segmento o por "ventana de comparación" para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. El alineamiento óptimo de estas secuencias para la comparación se puede realizar, en particular con ayuda de 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 búsqueda 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 de software Wisconsin Genetics, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o los servidores de internet en particular los del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), EMBL (<http://www.embl.org>) y el 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 se pueden usar 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 de restricción fuerte, es decir, condiciones de temperatura y de fuerza iónica seleccionadas de forma que permitan mantener la hibridación específica y la selectividad entre los polinucleótidos complementarios.

A modo de ilustración, las condiciones de restricción fuerte de la etapa de hibridación con el fin de definir los polinucleótidos descritos antes, son de forma ventajosa las siguientes: la hibridación ADN-ADN o ADN-ARN se lleva a cabo en dos etapas: (1) prehibridación a 42 °C durante 3 h en tampón de fosfato (20 mM pH 7,5) que contiene 5 x SSC (1 x SSC corresponde a una disolución de NaCl 0,15 M + citrato sódico 0,015 M), formamida al 50 %, dodecilsulfato sódico al 7 % (SDS), 10 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 5 % y ADN de esperma de salmón al 1 %; (2) hibridación propiamente dicha durante 20 h a una temperatura que depende del tamaño de la sonda (es decir: 42 °C, para una sonda de 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 lleva a cabo en 0,1 x SSC + SDS al 0,1 % durante 30 minutos a 60 °C, para una sonda de tamaño superior a 100 nucleótidos. Las condiciones de hibridación de restricción fuerte descritas antes para una sonda de tamaño definido,

el experto en la materia las puede adaptar para sondas de tamaño mayor o menor.

Por "técnica o procedimientos adecuados" se entiende aquí que se refiere a técnicas o procedimientos bien conocidos y usados clásicamente por el experto en la materia y expuestos en muchas obras, como en particular la titulada *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Sambrook J, Russell DW. (2000) Cold Spring Harbor Laboratory Press) [13].

El polinucleótido como se ha definido en c) presenta un porcentaje de identidad de al menos 80 % después de alineamiento óptimo con una secuencia como se ha definido en a) o b), preferiblemente 90 %, más preferiblemente 95 %, todavía más preferiblemente 98 %. El polinucleótido como se ha definido en c) incluye los polinucleótidos variantes de la secuencia SEQ ID NO: 1, es decir el conjunto de polinucleótidos que corresponden a variantes alélicas, es decir, variaciones individuales de la secuencia SEQ ID NO: 1. Estas secuencias variantes naturales corresponden a polimorfismos presentes en los mamíferos, en particular en el ser humano, y en particular polimorfismos que pueden conducir a la aparición de una patología, como por ejemplo la muerte celular de los islotes de Langerhans y diabetes.

Se entiende también que se designa mediante polinucleótido variante, cualquier ARN o ADNc que resulta de una mutación y/o de una variación de un sitio de empalme de la secuencia genómica cuyo ARNm tiene como ADN complementario el polinucleótido de secuencia SEQ ID NO: 1.

La similitud de una proteína en relación con una proteína de referencia se aprecia en función del porcentaje de restos de aminoácidos que son idénticos o que difieren por sustituciones conservativas, cuando se alinean las dos secuencias de modo que se obtenga la correspondencia máxima entre ellas. Se entiende por sustitución conservativa, 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 una similitud de al menos X % con una secuencia de referencia, se define como una proteína cuya secuencia puede incluir hasta 100-X alteraciones no conservativas por 100 aminoácidos de la secuencia de referencia. La expresión alteraciones no conservativas incluye eliminaciones, sustituciones no conservativas o inserciones consecutivas o dispersas de aminoácidos en la secuencia de referencia.

Están incluidas en las proteínas definidas en (g) las proteínas variantes de la secuencia SEQ ID NO: 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 particular a un truncado, eliminación, sustitución y/o adición de al menos un resto de aminoácido en relación con la secuencia SEQ ID NO: 2.

Preferiblemente, 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 antes, dicho polinucleótido aislado como se define en (c), es un polinucleótido variante de la secuencia SEQ ID NO: 1 que consta de una mutación que conduce a una modificación de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la secuencia SEQ ID NO: 1.

De acuerdo con otro modo de realización ventajoso del uso como se ha definido antes, dichos polinucleótidos aislados como se han definido en (b) o (d), se seleccionan entre la pareja de cebadores de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y la pareja de cebadores SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

De acuerdo con otro modo más de realización ventajoso del uso como se ha definido antes, dicho polinucleótido aislado se puede obtener por amplificación con ayuda de la pareja de cebadores como se ha definido antes.

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

De acuerdo con otro modo más de realización ventajoso del uso como se ha definido antes, dicha proteína como se ha definido en (g), es una variante de la secuencia SEQ ID NO: 2 que presenta una mutación asociada a la diabetes o a la hiperinsulinemia.

De acuerdo con otro modo más de realización ventajoso del uso como se ha definido antes, dicho fragmento como se ha definido en (f) presenta una secuencia seleccionada de las secuencias SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

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

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

- EST que presentan 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 presentan los números de acceso en la base de datos NCBI AX526723, AX526725 y AX526727.

Los fragmentos como se han definido antes, se pueden usar en particular como sondas o como cebadores para detectar/amplificar los polinucleótidos (ARN o ADN genómico) correspondientes al polinucleótido como se ha definido antes, en otros organismos.

Preferiblemente, las parejas de cebadores que se pueden usar son las que corresponden a las parejas definidas por las secuencias SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y las secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

Los autores de la invención describen también polinucleótidos que se pueden obtener por amplificación con ayuda de los cebadores como se han definido antes.

De acuerdo con un modo de realización ventajoso de dicho polinucleótido, se trata de un ARN interferente pequeño que corresponde al polinucleótido como se ha definido antes, de un tamaño inferior a 30 nucleótidos, preferiblemente de un tamaño comprendido entre 20 y 23 nucleótidos, que por interacción con los ARNm correspondientes de dicho polinucleótido, conducirá a su degradación. Estos siRNA se pueden obtener 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 de sentido directo que corresponden a los polinucleótidos definidos más arriba, que por interacción con proteínas implicadas en la regulación de la expresión de dicho polinucleótido, inducirán una inhibición o una activación de esta expresión.

Las sondas y cebadores como se han descrito antes, se pueden marcar directa o indirectamente mediante 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 los cebadores o de las sondas como se han definido antes, se lleva a cabo mediante elementos radiactivos o mediante moléculas no radiactivas. Entre los isótopos radiactivos usados se pueden citar el ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^3H y ^{125}I . Las entidades no radiactivas se seleccionan entre ligandos tales como la biotina, avidina, estreptavidina, digoxigenina, haptenos, colorantes, agentes luminiscentes como los agentes radioluminiscentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes, fluorescentes, fosforescentes.

Los polinucleótidos como se han definido antes, se pueden usar, por lo tanto, como cebador y/o sonda en procedimientos que aplican en particular la técnica de la PCR (amplificación en cadena por la polimerasa) (documento de EE.UU. n° 4.683.202). Se pueden usar de forma ventajosa otras técnicas de amplificación del ácido nucleico objetivo, como alternativa a la PCR. Actualmente existen muchos tipos de procedimientos que permiten esta amplificación, como por ejemplo la técnica de SDA (*Strand Displacement Amplification*) o técnica de amplificación por desplazamiento de hebra, la técnica TAS (*Transcription-based Amplification System* (sistema de amplificación basado en transcripción)), la técnica 3SR (*Self-Sustained Sequence Replication* (replicación de secuencia automantenida)), la técnica NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification* (amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos)), la técnica TMA (*Transcription Mediated Amplification* (amplificación mediada por transcripción)), la técnica LCR (*Ligase Chain Reaction* (reacción en cadena de la ligasa)), la técnica de RCR (Repair Chain Reaction (reacción de reparación en cadena)), la técnica CPR (Cycling Probe Reaction (reacción de sonda de ciclación)), la técnica de amplificación con la Q-beta-replicas. También se puede citar la PCR-SSCP que permite detectar mutaciones puntuales.

Estas técnicas, por supuesto, son bien conocidas por el experto en la materia.

Como sondas o como cebadores, los diferentes polinucleótidos definidos más arriba, permiten bien determinar el perfil de transcripción del gen correspondientes o una posible alteración de este perfil en una muestra biológica, o bien poner de manifiesto el gen correspondiente, variantes alélicas de este gen o una posible alteración funcional de este gen (cambio sustancial en la actividad de la proteína codificada por dicho gen) resultado de una mutación (inserción, eliminación o sustitución) de uno o varios nucleótidos a nivel de al menos un exón de dicho gen. Dichas mutaciones incluyen en particular eliminaciones, inserciones o sustituciones no conservativas a nivel de los codones correspondientes a restos de aminoácidos situados en un dominio esencial para la actividad biológica de la proteína.

Así pues, los autores de la invención describen un procedimiento de determinación del perfil de transcripción del gen correspondiente al polinucleótido definido antes o de una alteración de dicho perfil, en una muestra biológica, que comprende una primera etapa de obtención de los 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 más arriba, en condiciones adecuadas para la hibridación entre los ARN y la sonda, y una tercera etapa de revelado por cualquier medio adecuado de los híbridos formados.

Según un modo de aplicación de dicho procedimiento, la segunda etapa puede ser una etapa de retrotranscripción y/o de amplificación de los transcritos, realizada con ayuda de una pareja de cebadores como se ha descrito previamente, y la tercera etapa, una tercera etapa de revelado por cualquier medio adecuado de los ácidos nucleicos amplificados formados.

Dicho procedimiento de determinación del perfil de transcripción del gen, puede constar además de una etapa de evaluación de la tasa de transcripción del gen por comparación con una muestra testigo previamente seleccionada y opcionalmente del estudio de su correlación con un fenotipo detectable, como por ejemplo, la tasa de proinsulina convertida en insulina madura, el contenido de insulina de las células, la tasa de insulina secretada en respuesta a una estimulación por 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 testigo puede estar constituida por ejemplo por una muestra biológica que presenta una transcripción normal o alterada del gen correspondiente al polipéptido definido más arriba, al cual se aplica dicho procedimiento de determinación del perfil de transcripción del gen en las mismas condiciones.

También se describe aquí un procedimiento para poner de manifiesto el gen correspondiente al polinucleótido definido antes o variantes alélicas de dicho gen, o una alteración funcional de este gen, en una muestra biológica, que comprende una primera etapa de obtención, por cualquier medio adecuado, 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 más arriba, en condiciones adecuadas de hibridación específica entre los ADN y la sonda y una tercera etapa de revelado, por cualquier medio adecuado, de los híbridos formados.

De acuerdo con un modo de aplicación ventajoso de dicho procedimiento, la segunda etapa puede ser una etapa de amplificación realizada con ayuda de una pareja de cebadores como se ha descrito previamente, y la tercera etapa, una etapa de revelado por cualquier medio adecuado de los ácidos nucleicos amplificados formados. El procedimiento puede constar opcionalmente de una cuarta etapa de aislamiento y secuenciación de los ácidos nucleicos puestos de manifiesto.

Este último procedimiento puede permitir también aislar un alelo del gen correspondiente al polinucleótido definido más arriba, asociado a un fenotipo detectable, como por ejemplo, una variación de la glucemia posprandial, la presencia o no de una secreción de insulina, la tasa de glucosa en la circulación o de insulina secretada en respuesta a una estimulación con glucosa, y de una forma general a una patología de la diabetes de tipo I o II, o también a una anomalía del metabolismo del cinc. El cinc excretado en el transcurso de la liberación de insulina actúa en los canales de potasio, responsables de esta exocitosis por intermedio de los canales de calcio. Por lo tanto hay un bucle de retrocontrol [14]. El polipéptido definido antes está implicado en la acumulación de cinc en las vesículas que contienen insulina, y se encuentra también en el transcurso de la exocitosis sobre la membrana plasmática. Los mutantes de la proteína podrían modificar entonces 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 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 expresa dicho fenotipo detectable.

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

Se describe también aquí un kit de reactivos para llevar a cabo los procedimientos descritos antes, que comprende:

- a) al menos una sonda o una pareja de cebadores como se han descrito más arriba;
- b) los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de hibridación entre dicha sonda y/o dichos cebadores y el ácido nucleico de la muestra biológica a ensayar;
- c) los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación;
- d) los reactivos necesarios para la detección y/o determinación del híbrido formado entre dicha sonda y el ácido

nucleico de la muestra biológica o los ácidos nucleicos amplificados formados.

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

El polinucleótido definido antes se puede usar in vitro, como medio de estudio de:

a) el exceso de expresión del transportador (ZnT-8) en las líneas celulares modelo (insulinoma de rata INS-1 por ejemplo) y el impacto en la secreción de insulina en respuesta a una estimulación por la glucosa;

b) la sensibilidad de las células a la muerte celular (apoptosis) inducida por condiciones de estrés oxidante o concentración baja o alta de cinc;

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

Los autores de la invención describen también la proteína codificada por el polinucleótido definido antes.

Por "proteína" se entiende que se designa un encadenamiento preciso de aminoácidos, modificados o no, que constan o no de aminoácidos no naturales.

La proteína definida antes, se obtiene a partir de una célula beta, por síntesis química, o por técnicas de ADN recombinante, en particular a partir del vector de expresión que comprende un inserto constituido por el polinucleótido como se ha definido antes.

La proteína definida antes, cuando se obtiene por síntesis química, se puede obtener por una de numerosas vías de síntesis peptídicas conocidas, por ejemplo, técnicas que usan fases sólidas o técnicas que usan fases sólidas parciales, por condensación de fragmentos o por una síntesis en disolución clásica. En este caso, la secuencia de la proteína se puede modificar con el fin de mejorar su solubilidad, en particular en disolventes acuosos. Dichas modificaciones son conocidas para el experto en la materia, como por ejemplo por eliminación de dominios hidrófobos o sustitución de aminoácidos hidrófobos por aminoácidos hidrófilos.

Preferiblemente, dicha proteína es una proteína que comprende o presenta la secuencia SEQ ID NO: 2 (correspondiente a la proteína codificada por el gen *ZnT-8*).

Los autores de la invención describen también un fragmento de la proteína como se ha definido antes, caracterizado porque se selecciona del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, así como un chip de proteínas que comprende una proteína o un fragmento de proteína como se han definido antes.

La proteína, el fragmento de proteína o el chip de proteínas como se han definido antes, se pueden usar para detectar la presencia de anticuerpos dirigidos contra dichas proteínas, en el suero de un individuo.

Los autores de la invención describen también el uso de la proteína o del fragmento de proteína como se han definido antes, para mediciones por procedimientos inmunoquímicos e inmunoenzimáticos, así como para la investigación de anticuerpos dirigidos contra la proteína según la invención.

También se describe un vector de clonación y/o de expresión en el que está insertado el polinucleótido como se ha definido antes.

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

Dichos vectores constan preferiblemente de: un promotor, señales de inicio y de terminación de la traducción, así como de regiones adecuadas de regulación de la transcripción. Se deben poder mantener de forma 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 células y/o de tejido particular, como por ejemplo el páncreas. Estas diferentes secuencias de control se eligen en función del hospedante celular usado.

El polinucleótido definido antes se puede insertar en vectores de replicación autónoma dentro del hospedante seleccionado o vectores integradores del hospedante seleccionado.

Entre los sistemas de replicación autónoma, se usan preferiblemente en función de la célula hospedante, sistemas de tipo plasmídico o viral. Los vectores víricos pueden ser en particular adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus de la viruela y herpesvirus. El experto en la materia conoce las tecnologías que se pueden usar para cada uno de estos sistemas.

5 Cuando se desea la integración de la secuencia en los cromosomas de la célula hospedante, se pueden usar, por ejemplo, sistemas de tipo plasmídico o vírico; dichos virus son, por ejemplo, retrovirus, o virus asociados a adenovirus (virus adenoasociados o AAV).

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

15 Dichos vectores se preparan de acuerdo con los procedimientos usados habitualmente por el experto en la materia, y los vectores recombinantes que resultan se pueden introducir en el hospedante adecuado por procedimientos estándar, tal como por ejemplo, por lipofección, electroporación, choque térmico, transformación después de permeabilización química de la membrana, fusión celular.

20 La proteína definida antes se puede purificar de acuerdo con técnicas conocidas por el experto en la materia. Así pues, la proteína se puede purificar a partir de lisatos y extractos celulares, del líquido sobrenadante del medio de cultivo, por procedimientos usados individualmente o en combinación, tales como el fraccionamiento, procedimientos cromatográficos, técnicas de inmunoafinidad con ayuda de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos, etc.

25 Preferiblemente, la proteína se purifica de acuerdo con 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 de acuerdo con el procedimiento descrito por T.C. Thomas, M.G. McNamee, ("Purification of membrane proteins". Section IX, pp 499-520, en *Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification*, Editado por M.P. Deutscher, vol 182, Academic press, New-York, 1990")

30 Los autores de la invención también han podido mostrar, por un estudio del potencial de 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 se pueden producir anticuerpos monoclonales o policlonales.

35 También se describen anticuerpos mono o policlonales, caracterizados porque son capaces de reconocer específicamente una proteína como se ha definido antes.

Preferiblemente, los anticuerpos reconocen específicamente la proteína de secuencia SEQ ID NO: 2, sus fragmentos o variantes de dicha proteína como se han definido antes.

40 De forma preferida, estos anticuerpos reconocen específicamente los bucles extracelulares de la proteína de acuerdo con la invención, que corresponden a las SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 10 (PEP1, PEP2 y PEP4) y/o un bucle intracelular de la proteína de acuerdo con la invención que corresponde a la SEQ ID NO: 9 (PEP3).

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

50 Dichos anticuerpos se pueden obtener directamente a partir de suero humano, o a partir de suero de animales inmunizados con las proteínas como se han definido antes, en particular producidos por recombinación genética o por síntesis peptídica.

Los anticuerpos policlonales específicos se pueden obtener de acuerdo con modos de trabajo habituales. Los anticuerpos monoclonales específicos se pueden obtener de acuerdo con el procedimiento clásico de cultivo de hibridomas.

También se describe un chip de proteínas que comprende al menos un anticuerpo como se ha definido antes.

60 Los autores de la invención también describen el uso de anticuerpos o de un chip con anticuerpo como se han definido antes, para detectar y/o purificar una proteína como se ha definido más arriba, preferiblemente bucles extracelulares o intracelulares de dicha proteína, preferiblemente secuencias que corresponden a las SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 10.

De forma general, estos anticuerpos se pueden usar de forma ventajosa en cualquier situación en que deba observarse la expresión de una proteína como se ha descrito antes, normal o mutada.

En particular, los anticuerpos monoclonales se pueden usar para detectar estas proteínas en una muestra biológica. Constituyen, por lo tanto, un medio de análisis inmunocitoquímico o inmunohistoquímico de la expresión de proteínas definidas antes, en particular la proteína de secuencia SEQ ID NO: 2 o una de sus variantes, en cortes de tejidos específicos. En general, para dichos análisis los anticuerpos usados están marcados con el fin de que sean detectables, por ejemplo con compuestos inmunofluorescentes, por marcaje con oro o en forma de inmunoconjugados enzimáticos.

Pueden permitir poner de manifiesto una expresión anómala de estas proteínas en tejidos o extracciones biológicas.

Se describe también un procedimiento para detectar en una muestra biológica la proteína ZnT-8, que comprende una primera etapa de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo como se ha definido antes, y una segunda etapa de poner de manifiesto por cualquier medio adecuado, el complejo de antígeno-anticuerpo formado.

Un kit que permite llevar a cabo el procedimiento descrito antes comprende:

a) al menos un anticuerpo monoclonal o policlonal como se ha definido más arriba;

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

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.

La presente invención trata del uso de un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de secuencias SEQ ID Nos: 7, 8, 9 y 10, para detectar y/o seleccionar islotes de Langerhans, preferiblemente células beta, a partir de una muestra de páncreas humano o animal, en particular de páncreas de ratón, rata, conejo y cerdo. Esta selección se puede realizar mediante un equipo de citometría de flujo (FACS) en lo que se refiere 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 o Ficoll-diatrizoato de sodio, o el procedimiento de elección que es un gradiente de albúmina sobre un separador de células.

Así pues, la invención tiene por objeto un procedimiento de selección de células beta de los islotes de Langerhans, que comprende una primera etapa de poner en contacto las células de una muestra biológica que puede contener dichos islotes y/o células, con un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de secuencias SEQ ID NO: 7, 8, 9 y 10", una segunda etapa de poner de manifiesto por cualquier medio adecuado, las células marcadas por el anticuerpo, y una tercera etapa de aislamiento por cualquier medio adecuado, de las células marcadas.

Los anticuerpos que reconocen específicamente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de secuencias SEQ ID Nos: 7, 8, 9 y 10, también se pueden usar, de acuerdo con la invención, para el seguimiento del proceso de diferenciación de células madre en células beta de los islotes de Langerhans, en particular humanas o animales, así como para la selección de células que expresan la proteína ZnT-8, en particular la proteína de secuencia SEQ ID NO: 2, después de diferenciación.

Así pues, la invención tiene por objeto un procedimiento para el seguimiento del proceso de diferenciación de células madre en células de islote pancreático o células beta, que comprende una etapa de poner en contacto las células de una muestra biológica que puede contener dichas células madre que se están diferenciando, con un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de secuencias SEQ ID Nos: 7, 8, 9 y 10, una segunda etapa de poner de manifiesto por cualquier medio adecuado, las células marcadas por el anticuerpo, y una tercera etapa de visualización por cualquier medio adecuado, de las células marcadas.

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

De acuerdo con una aplicación preferida de los usos y procedimientos de la invención, el anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de secuencias SEQ ID Nos: 7, 8, 9 y 10, es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un fragmento Fab o F(ab')₂. Este anticuerpo también puede estar marcado y/o comprendido en un chip de proteínas.

Además de las disposiciones precedentes, la invención comprende también otras disposiciones que saldrán de la siguiente descripción, que se refieren a ejemplos de aplicación de la invención, así como a las figuras adjuntas en

las 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 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 salivales, 14: tiroides, 15: glándulas suprarrenales, 16: páncreas, 17: ovarios, 18: útero, 19: próstata, 20: piel, 32: leucocitos, 22: médula ósea, 23: cerebro fetal, 24: hígado fetal. La expresión de dicho ARNm se detecta solamente en el páncreas (pista 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 insulinooma de rata (INS-1, pista 1), islotes pancreáticos humanos fetales (pista 2) y de adulto (pista 3), en comparación con una línea de células epiteliales (línea Hela). El ARNm se detecta en la línea de insulinooma de rata y los islotes pancreáticos adultos y fetales, mientras que no se detecta ningún transcrito en las células epiteliales (línea Hela). El mensajero de la actina se usa como control.

- la figura 3 ilustra el análisis con microscopio 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 a nivel de la membrana plasmática.

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

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

EJEMPLO 1: Clonación del ADN que codifica la proteína Znt-8

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

El ADN que codifica Znt-8 se ha amplificado por PCR a partir del ARNm de islotes de páncreas humanos preparados de acuerdo con la técnica dada en Kenmochi T. y col. (*Pancreas*, 2000, 20, 2, 184-90), con ayuda de la pareja de cebadores (SEQ ID NO: 5: 5'-ACTCTAGAAATGGAGTTTCTTGAAAGAACGT A y SEQ ID NO: 6: 5'-AATCTA GAGTCACAGGGGTCTTCACAGA.), definidos a partir de la secuencia del gen *Znt-8*.

De forma más precisa, se extrajeron los ARN totales a partir de los islotes usando el kit "RNA extraction kit" (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ARN obtenidos así se determinaron 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) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y la pareja de cebadores SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. La transcripción inversa se llevó a cabo a 52 °C durante 30 min y después se amplificaron los ADNc sintetizados mediante 30 ciclos (30 s a 94 °C, 30 s a 53 °C, 1 min a 72 °C) y un alargamiento 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 ADN que presenta la secuencia SEQ ID NO: 1 se purificó mediante 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 ADNc comerciales preparados a partir de diferentes tejidos humanos usando los siguientes cebadores SEQ ID NO: 3: 5'-GAT GCT GCC CAC CTC TTA ATT GAC y SEQ ID NO: 4: 5'-TCA TCT TTT CCA TCC TGG TCT TGG. Los cebadores (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4) se eligieron 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 salivales, 14: tiroides, 15: glándulas suprarrenales, 16: páncreas, 17: ovarios, 18: útero, 19: próstata, 20: piel, 32: leucocitos, 22: médula ósea, 23: cerebro fetal, 24: hígado fetal.

De forma más precisa, se mezclaron 2 µl de ADNc con 2 cebadores específicos (1 µM final) y una mezcla clásica de PCR (1 unidad de Taq DNA polimerasa, tampón con magnesio 1,5 mM, dNTP 10 mM). La amplificación se llevó a cabo por 30 ciclos (30 s a 94 °C, 30 s a 53 °C, 1 min a 72 °C) y una etapa final de alargamiento de 5 min a 72 °C. Los productos después 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 de la invención es expresado únicamente en células del páncreas (pista 16 de la figura 1A) y no en las células de los otros 23 tejidos analizados (pistas 1 a 15 y 17 a 24 de la figura 1A).

EJEMPLO 3: Expresión del ARN mensajero correspondiente al polinucleótido de la invención en células de páncreas fetal y de adulto en una línea de insulinoma de rata (INS-1)

El análisis de la expresión del ARN mensajero que codifica la proteína ZnT-8 se llevó a cabo 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 coll., *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. Se extrajeron los ARN totales como se ha descrito en el ejemplo 1 y la concentración de ARN se ajustó a 1 ng/ μ l para el ZnT-8 o 1 pg/ μ l para el control β -actina. Se amplificaron los transcritos y después se analizaron los productos de amplificación 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 es expresada en las células de los islotes pancreáticos humanos fetales y adultos y en la línea de insulinoma de rata (INS-1), pero no en la 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 ADN correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 1 (Znt-8). El producto de la PCR de 1123 pares de bases obtenido de acuerdo con 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 forma transitoria en una línea de células epiteliales (Hela) y de forma estable en una línea de insulinoma de rata (INS-1).

Las células epiteliales HeLa (número en ATCC CCL-2) se cultivaron en medio Opti-MEM (Modified Eagle's Medium, Life Technologies) complementado con 5 % de suero de ternero descomplementado y glutamina 2 mM. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada enriquecida al 5 % en CO₂.

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

Las células cultivadas en cajas Petri de 35 mm se transfectaron con el vector pZnT-8-GFP (1 μ g de ADN por 10^6 células), usando el reactivo Exogen500 (Euromedex) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de transfección por el vector pZnT-8-GFP, las células INS-1 se seleccionaron, se clonaron en el medio anterior al que se añadió G418 400 μ g/ml, y se observó la fluorescencia de los clones con un microscopio de fluorescencia invertido (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 h después de la transfección, por observación de la fluorescencia como se ha precisado antes para los clones de las células INS-1 transfectadas de forma estable.

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

Los resultados ilustrados por la figura 4 (línea INS-1) muestran que la proteína ZnT-8 se localiza en las vesículas de secreción de insulina; esta localización indica que ZnT-8 está implicada en la maduración de la insulina; además, en la medida en que este experimento se ha llevado a cabo en el estado basal (ausencia de estimulación por la glucosa), la proteína estará igualmente presente en la membrana plasmática en el transcurso de 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 transmembranales se realizaron con los programas TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.htm) y SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/menu0.html>).

La proteína ZnT-8 completa tiene 6 dominios transmembranales predichos (aminoácidos 74-95, 107-126, 141-163, 177-196, 216-240, 246-267), estando situados los extremos N y C 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 SEQ ID NO: 7: PEP1: HIAGSLAVVTDAHLL; SEQ ID NO: 8: PEP2: CERLLYPDYQIQATV; SEQ ID NO: 9: PEP3: CLGHNHKEVQANASVR, SEQ ID NO: 10: PEP4: YFKPEYKIADPIC se sintetizaron en fase sólida, de acuerdo con el procedimiento descrito originalmente por Merrifield y col. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 85: 2149-) (1964), se purificaron y conjugaron con una proteína portadora (albúmina, por ejemplo). Los péptidos conjugados se inyectaron en conejos de acuerdo con el siguiente protocolo de inmunización:

J0: primera inmunización; J14: segunda inmunización; J28: tercera inmunización; J38: verificación de la especificidad; J56: cuarta inmunización; J66 y J80: recuperación del suero. El suero se puede usar directamente o después de purificación en columna de proteína A con elución en medio ácido. Estas operaciones fueron realizadas por la société Eurogentec SA, Bélgica.

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

El anticuerpo se purifica por cromatografía de afinidad sobre columna de proteína G (Pharmacia). La columna (1 ml) equilibrada con tampón de fosfato sódico 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4, se carga con 5 ml de suero, después se lava con 20 ml del mismo tampón para eluir las proteínas no fijadas. Después el anticuerpo se desengancha con una disolución de glicina, HCl 0,1 M, pH 2,5, y después se neutraliza con 40 µl de tampón Tris HCl 2 M, pH 10,0.

Se diluyen 2 mg de anticuerpo en 1 ml de tampón de fosfato a pH 8,0. Se prepara de forma extemporánea una disolución de NHS-FITC (SIGMA; 1 mg/ml en DMSO). Se mezclan 75 µl de la disolución de NHS-FITC con la disolución de anticuerpo y después la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 45 min. El anticuerpo marcado se purifica en columna PD-10 (PHARMACIA) de la siguiente forma: la columna se lava con 30 ml de PBS, se carga con 1 ml de la disolución de anticuerpo marcada que se va a purificar, y después con 5 ml de PBS y después se recogen 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 PF, Sutherland DE. 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⁺ channels. *J. Physiol.* 2000; 529 Pt 3: 723-34.
4. Meyer K, Irminger JC, Moss LG, de Vargas LM, 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 DW, Gohde W, Flynn GJ, Morris PJ. In vitro staining of islets of Langerhans for fluorescence-activated cell sorting. *Transplantation* 1991; 52: 450-2.
9. Kallan AA, Roep BO, Arden SD, Hutton JC, de Vries RR.: 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 PD, Millard SH, Forbes IJ, Kapaniris O, Slavotinek A, Betts WH 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 RA. Beta-granule transport and exocytosis. *Semin.Cell. Dev. Biol.* 2000 ; 11 : 253-66.
12. Palmiter RD, Findley SD. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers
résistance to zinc. *Embo J.* 1995 ; 14 : 639-49.
- 5 13. Sambrook J, Russell DW. (2000) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
14. Bloc A et al, *J Physiol.* 2000, Dec. 15 ; 529 Pt 3 : 723-34)
- 10 15. Tomita T. *Pathology International* 2002 ; 52 : 425-432.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

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

10 <130> CGA263S85

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

15 <210> 1

<211> 1110

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <400> 1

```

atggagtttc ttgaaagaac gtatcttggtg 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 agaggtcgtg ggtgggcaca ttgctgggag tcttgctgtt      300
gtcacagatg ctgcccacct cttaattgac ctgaccagtt tcctgctcag tctcttctcc      360
ctgtggctgt catcgaagcc tccctctaag cggctgacat ttggatggca ccgagcagag      420
atccttggtg ccctgctctc catcctgtgc atctgggtgg tgactggcgt gctagtgtac      480
ctggcatgtg agcgcctgct gtatcctgat taccagatcc aggcgactgt gatgatcatc      540
gtttccagct gcgcagtggc ggccaacatt gtactaactg tggttttgca ccagagatgc      600
cttgccaca atcacaagga agtacaagcc aatgccagcg tcagagctgc ttttgtgcat      660
gcccttgagg atctatttca gagtatcagt gtgctaatta gtgcacttat tatctacttt      720
aagccagagt ataaaatagc cgacccaatc tgcacattca tcttttccat cctgggtcttg      780
gccagcacca tcaactatctt aaaggacttc tccatcttac tcatggaagg tgtgccaaag      840
agcctgaatt acagtgggtg gaaagagctt attttagcag tcgacggggt gctgtctgtg      900
cacagcctgc acatctggtc tctaacaatg aatcaagtaa ttctctcagc tcatgttgct      960
acagcagcca gccgggacag ccaagtgggt cggagagaaa ttgctaaagc ccttagcaaa      1020
agctttacga tgcactcact caccattcag atggaatctc cagttgacca ggaccccgac      1080
tgccctttct gtgaagaccc ctgtgactag                                     1110

```

25 <210> 2

<211> 369

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 2

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

	<210> 3	
	<211> 24	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
10	<400> 3	
	gatgctgccc acctcttaac tgac	24
15	<210> 4	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 4	
25	tcatcttttc catcctgggc ttgg	24
	<210> 5	
	<211> 31	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	

<400> 5
actctagaat ggagtttctt gaaagaacgt a 31

5 <210> 6
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 6

15 aatctagagt cacaggggtc ttcacaga 28

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 7

His Ile Ala Gly Ser Leu Ala Val Val Thr Asp Ala Ala His Leu Leu
1 5 10 15

25 <210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 8

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

35 <210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40 <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

50 Tyr Phe Lys Pro Glu Tyr Lys Ile Ala Asp Pro Ile Cys
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de secuencia SEQ ID Nos: 7, 8, 9 y 10, para detectar y/o seleccionar islotes de Langerhans y/o células beta de los islotes de Langerhans, a partir de una muestra de páncreas humano o animal.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o un fragmento Fab o F(ab')₂.
- 15 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizado porque** dicho anticuerpo está marcado.
- 20 4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** dicho anticuerpo está contenido en un chip de proteínas.
- 25 5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra de páncreas animal procede de un animal seleccionado de ratones, ratas, conejos y cerdos.
- 30 6. Procedimiento de selección de células beta de los islotes de Langerhans, que comprende una primera etapa de poner en contacto las células de una muestra biológica que puede contener dichos islotes y/o células, con un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de secuencia SEQ ID Nos: 7, 8, 9 y 10, una segunda etapa de detección de las células marcadas por el anticuerpo y una tercera etapa de aislar las células marcadas.
- 35 7. Uso de un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de secuencia SEQ ID Nos: 7, 8, 9 y 10, para seguir el proceso de diferenciación de las células madre en células beta de los islotes de Langerhans.
- 40 8. 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 células de una muestra biológica que puede contener dichas células madre que se están diferenciando, con un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de secuencia SEQ ID Nos: 7, 8, 9 y 10, una segunda etapa de poner de manifiesto las células marcadas por el anticuerpo y una tercera etapa de visualizar las células marcadas.
- 45 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, o procedimiento según la reivindicación 6 o la reivindicación 8, **caracterizado porque** dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un fragmento Fab o F(ab')₂.
10. Uso o procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizado porque** dicho anticuerpo está marcado.
11. Uso o procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, **caracterizado porque** dicho anticuerpo está contenido en un chip de proteínas.

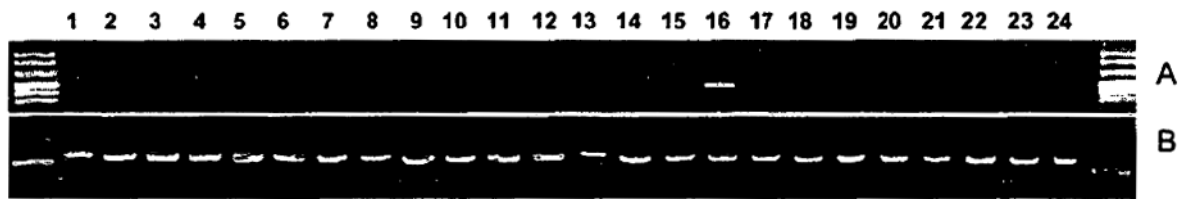


Figura 1

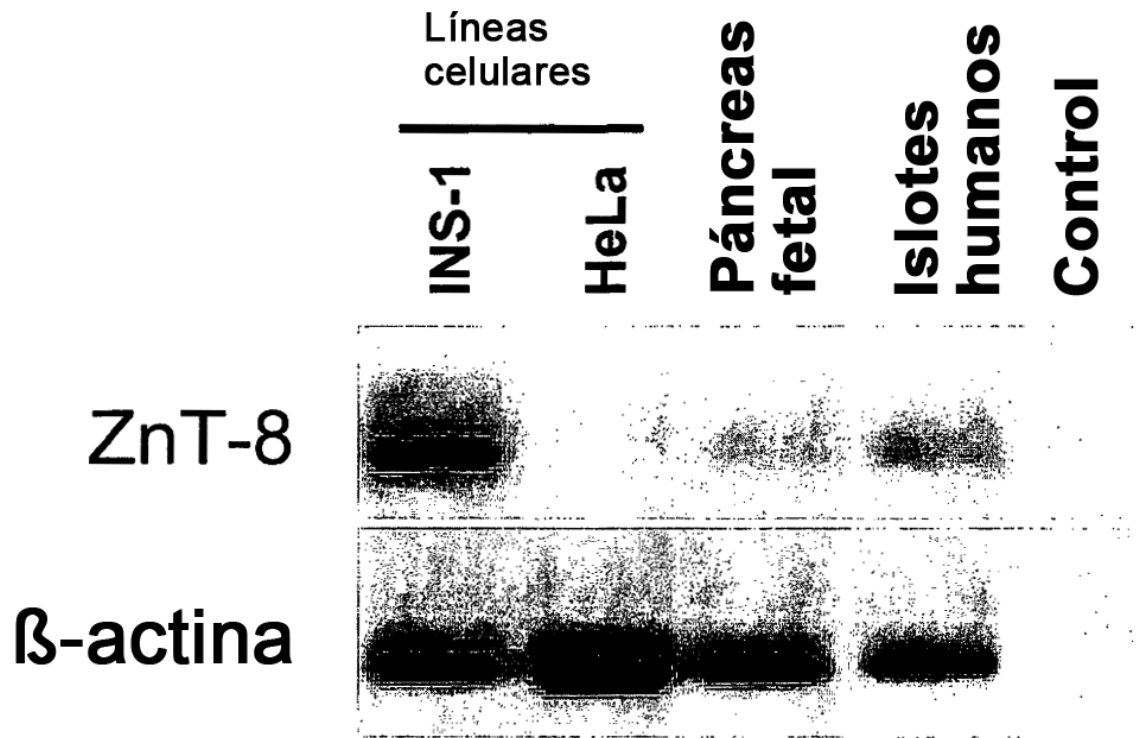


Figura 2



Figura 3

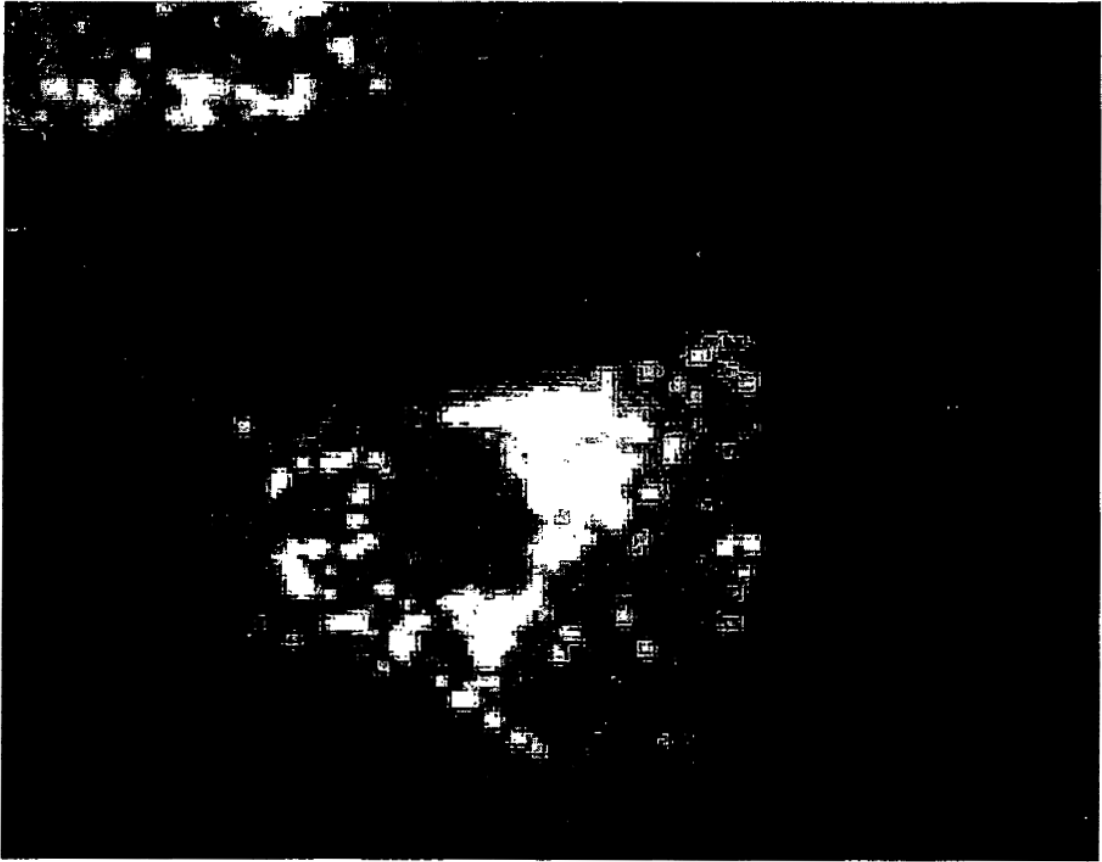


Figura 4