

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 533 566**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2007 E 07870089 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2118309**

(54) Título: **Diana diagnóstica y terapéutica para enfermedades autoinmunitarias y sus usos**

(30) Prioridad:

29.12.2006 US 882815 P

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

13.04.2015

(73) Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO, A BODY CORPORATE (100.0%)
1800 Grant Street, 8th Floor
Denver, CO 80203 , US**

(72) Inventor/es:

**HUTTON, JOHN, C.;
WENZLAU, JANET, M.;
JENSEN, JAN y
DAVIDSON, HOWARD**

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 533 566 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

Diana diagnóstica y terapéutica para enfermedades autoinmunitarias y sus usos

5 Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

La presente solicitud incorpora por referencia la descripción completa de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 60/882.815, presentada el 29 de diciembre de 2006.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a la identificación de dianas autoantígenicas, y particularmente, a dianas autoantígenicas en la diabetes autoinmunitaria de tipo I (DT1), y más particularmente, a la proteína ZnT8 como un nuevo autoantígeno, sobre el que se basan las herramientas y métodos terapéuticos, diagnósticos y pronósticos y que se describen en el presente documento.

Antecedentes de la invención

Los trastornos autoinmunitarios son afecciones causadas por una respuesta inmunitaria contra los tejidos propios del organismo. Los trastornos autoinmunitarios producen la destrucción de uno o más tipos de tejidos corporales, el crecimiento anómalo de un órgano, o cambios en la función orgánica. El trastorno puede afectar solo a un tipo de órgano o tejido o puede afectar a órganos y tejidos múltiples.

La diabetes autoinmunitaria de tipo 1 (DT1) en seres humanos y en el modelo de ratón NOD es una enfermedad autoinmunitaria poligénica dependiente de células T, caracterizada por la destrucción selectiva de las células B de los islotes de Langerhans (1-3) que proviene de una interrupción en la tolerancia contra antígenos de células B (4) en individuos susceptibles que tienen defectos intrínsecos en mecanismos inmunomoduladores críticos (5) (por ejemplo, individuos que exhiben una respuesta patógena en lugar de immunoprotectora contra sí mismos). Las células pancreáticas exocrinas y endocrinas, que comparten el mismo linaje evolutivo que el de las células B y que a menudo están en contacto directo con células B, no están en su mayor parte afectadas, y la insulitis se resuelve una vez que se pierden las células B, lo que sugiere que las dianas autoinmunitarias son principalmente específicas de células B. Muchos de los autoantígenos conocidos en la diabetes, tales como la insulina y la IGRP (proteína relacionada con la glucosa 6-fosfatasa específica de los islotes), reflejan esta especificidad celular, sin embargo, la lista de dianas inmunitarias conocidas es en absoluto exhaustiva. Esto se aplica especialmente a los antígenos reconocidos por el brazo celular del sistema inmunitario, y las dianas de la mayoría de las células T CD4⁺ diabetogénicas siguen siendo insuficientes a pesar de más de una década de investigación. En los últimos años han aparecido unas cuantas dianas nuevas usando los procedimientos de exploración inmunológico que originalmente identificaron moléculas tales como GAD65, IA-2 e ICA 69.

Muchos individuos con una fuerte predisposición genética a la DT1 nunca desarrollan enfermedad aparente (el 50 % de gemelos monocigotos con un miembro diabético sigue siendo discordante) y factores codificados por líneas no germinales influyen significativamente en la velocidad de progresión de la DT1 (7). Esta baja penetrancia e historial natural variable apuntan a la importancia de factores ambientales, y también a la naturaleza estocástica del propio sistema inmunitario. Las estrategias terapéuticas que desplazan este equilibrio hacia un entorno más toleragénico tienen la posibilidad de prevenir o reducir la progresión de la autoinmunidad a insulinitis destructora.

Parece haber un número limitado de clones de células T reactivas en células de los islotes en infiltrados pancreáticos previos en ratones NOD (16; 17) y la progresión de la enfermedad parece implicar la propagación epítópica y (18) la maduración por avidez con respuestas previas de células T (19) junto con el reclutamiento de nuevos autoantígenos (20). Numerosos clones de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas de los islotes se han aislado de infiltrados de bazo, ganglios linfáticos o islotes de ratones NOD pre-diabéticos o recientemente diabéticos (21-25) cuyos antígenos afines están mal definidos y no parecen corresponderse con ninguno de los marcadores serológicos de autoinmunidad de la diabetes conocidos en seres humanos, tales como GAD65, las proteínas de membrana de gránulos de insulina ICA512 (IA-2) y fogrina (IA-2B) (20), carboxipeptidasa E (26), ICA69 (27) y glucolípidos sulfatados (28). Las dianas moleculares de células T autorreactivas pueden incluir bien un componente no identificado de células B, o proteínas de células B conocidas que son intrínsecamente incapaces de suscitar una respuesta humoral. Por consiguiente, la definición de antígenos afines para estos continúa siendo un objetivo importante, y con los recientes avances en las técnicas genómicas y proteómicas, aparece ahora una finalidad realista. Por tanto la diana del clon NY8.3 CD8⁺ bien estudiado (23) mostró recientemente ser un péptido derivado de la proteína de células B IGRP (proteína relacionada con la glucosa 6-fosfatasa específica de los islotes) usando una combinación de un bioensayo sensible y análisis de péptidos proteómicos eluidos de moléculas H-2K^d de células de insulinoma NIT1 (29).

Aunque de por sí la respuesta tumoral contribuye probablemente poco a la patogénesis de la enfermedad (30), la identificación de las dianas moleculares de linfocitos B es también el objetivo importante, dado que en la DT1 las células B desempeñan una función en la presentación antigénica (31). Además, los anticuerpos circulantes

proporcionan marcadores preclínicos útiles para la autoinmunidad diabética. La producción de anticuerpos de alta afinidad es un proceso dependiente de linfocitos T y por tanto es razonable esperar que las moléculas reconocidas por autoanticuerpos deban ser también las dianas de linfocitos T diabetogénicos autorreactivos. Esta hipótesis parece correcta, al menos para la insulina, fogrina y GAD65 (32-34). La lista de dianas conocidas, aunque larga, está lejos de ser exhaustiva. Esto se pone de manifiesto por el hecho de que el diagnóstico serológico de la pre-DT1 determinada por inmunohistoquímica del páncreas humano es aún el índice más sensible, simplemente porque define dianas adicionales que no están entre los autoantígenos definidos en términos moleculares.

Hay un continuo debate sobre si en la DT1, y en otras enfermedades autoinmunitarias, hay autoantígenos primarios o iniciadores. Para la DT1, el mejor candidato en el ratón NOD es actualmente la insulina (33; 35-38) aunque también se ha propuesto que la IGRP puede desempeñar este papel crucial (29; 39; 40) basándose en la frecuencia de células T precursoras que reconocen este antígeno en infiltrados de los islotes. Una vista alternativa es que la enfermedad sea resultado de la activación policlonal debido a una interrupción en los mecanismos toleragénicos normales que, de otra manera, generaría células reguladoras dirigidas contra las mismas moléculas (41). Dada la última situación, los inventores llegaron a la hipótesis de que cualquier molécula que sea una diana de autoinmunidad significativa en la DT1 es un candidato para su uso en terapia basada en antígenos. Las estrategias de tolerización eficaces en ratones NOD basadas en inmunización con los epítopos nativos de insulina (42; 43), GAD65 (44-48), HSP 65 (49) e IGRP (50) parecen corroborar esto. Además, estudios preliminares realizados por los inventores con IA-2 y fogrina muestran que un epítopo peptídico conocido de ser humano y de ratón (péptido 7 (51)) retrasa del mismo modo la aparición de la enfermedad cuando se administra neonatalmente a ratones NOD. Otras dianas de células T conocidas, incluyendo IAPP (52), IMOGEN 38 (53-57) parecen no haberse caracterizado en ese sentido.

En la bibliografía científica abundan ejemplos del supuesto mimetismo molecular entre los autoantígenos y las proteínas virales basándose en la homología de secuencias (58). Por ejemplo, en el caso de la DT1, se ha propuesto reactividad cruzada entre GAD65 y la proteína P2-C del Coxsackie B3 (59) o la proteína principal de unión a ADN de citomegalovirus humano (60), e IA-2 con VP7 de rotavirus (61) o VP1 del Coxsackie B4 (62). De manera similar, también se ha postulado el mimetismo entre proinsulina y GAD65 (63). La exposición a un imitador molecular podría, en principio, desencadenar autoinmunidad, o proteger contra este, estableciendo y consolidando redes inmunitarias. Estudios epidemiológicos de desencadenamiento autoinmunitario por agentes infecciosos en seres humanos, no han sido particularmente informativos posiblemente debido al largo pródromo de la enfermedad y al fracaso para identificar un organismo específico (o serotipo inusual de un patógeno común) que está implicado (14). Las respuestas protectoras que, por su propia naturaleza, son fundamentales para la "hipótesis de higiene" son más difíciles de establecer.

El ratón diabético no obeso (NOD, *non-obese diabetic*) es actualmente el mejor modelo de la DT1 humana (8) donde son obvios tres estadios de progresión de la enfermedad, concretamente, la expansión de células T autorreactivas ("punto de control 0"), su retorno a los islotes pancreáticos ("punto de control 1"), y la transición desde una per-insulitis benigna a una insulitis invasiva dando lugar a la destrucción de células B ("punto de control 2") (9). Se ha postulado que el paso a través del "punto de control 0" coincide con una oleada de apoptosis de células de los islotes que conduce a una intensificación de presentación de antígenos de células B en los ganglios linfáticos pancreáticos. Una hipótesis relacionada sugiere que la exposición a nuevos antígenos en el intestino en este momento (cuando se está produciendo la ablactación) da como resultado la activación de células T Th1 polarizadas que posteriormente migran al páncreas y perturban la respuesta en los ganglios linfáticos de drenaje, de tal manera que se produce una respuesta inmungénica contra antígenos de células de los islotes. En la DT1 humana también se ha propuesto una implicación similar de apoptosis de células de los islotes postnatales (10), anomalías congénitas de células B (11) y del régimen alimenticio (12; 13) o activación enteroviral (14), aunque hasta ahora, sus funciones relativas (si las hubiera), y generalmente como factores fortuitos, continúan siendo controvertidas. No obstante, está claro que los antígenos de células de los islotes son críticos para el proceso de la enfermedad (15) y que un conocimiento detallado de sus características moleculares es esencial tanto para el diseño lógico de las inmunoterapias, como para el control e identificación de individuos que están en riesgo.

Solo en los Estados Unidos hay más de 2 millones de pacientes con diabetes de tipo 1 que, de por vida, necesitan dosis diarias múltiples de insulina para seguir viviendo. La mayoría de estos individuos padecerán complicaciones diabéticas de por vida y se calcula que, a cualquier edad, su esperanza de vida puede reducirse hasta un tercio. La prevención o incluso el retraso del desarrollo de la enfermedad tendrían por tanto inmensos beneficios económicos y sociales. Hay diversas estrategias experimentales para la prevención y regresión de la diabetes que se ha demostrado que son muy eficaces en modelos de roedores de DT1 y que actualmente se están probando en ensayos clínicos. Por ejemplo, son particularmente prometedores los hallazgos preliminares realizados con un tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-CD3. Para ser eficaz, una terapia basada en inmunidad requiere ensayos diagnósticos para establecer si la intervención es apropiada y cuando implementar la terapia con respecto a la estadificación de la enfermedad. Una vez iniciada la terapia, es esencial evaluar su eficacia a corto y largo plazo. Los ensayos diagnósticos basados en la autorreactividad humoral o celular contra autoantígenos que son útiles en el control de la progresión de la enfermedad son esenciales para tomar cualquier decisión para tratar a un paciente y en el control posterior de las consecuencias del tratamiento.

Por lo tanto, hay una continua necesidad en la técnica de mejorar los ensayos diagnósticos para la DT1, así como de nuevos agentes inmunoterapéuticos basados en dianas de la enfermedad. Además, muchas dianas identificadas en una enfermedad autoinmunitaria, tal como la DT1, también serán dianas en otras enfermedades autoinmunitarias, ampliando de este modo las estrategias diagnósticas y terapéuticas disponibles en diversas afecciones autoinmunitarias.

Sumario de la invención

- Una realización de la invención se refiere a diversos fragmentos de ZnT8. En un aspecto, el fragmento consiste en 10 un fragmento representado por una cualquiera de las SEC ID Nos: 9, 10, 14-18, 22, 23, 49-51 o 53-65 en el que el fragmento comprende la secuencia de aminoácidos SLTIQMES (posiciones 346-353 de la SEC ID Nº: 2) y la posición 325 de la SEC ID Nº: 2.
- Un fragmento de la invención comprende la posición 325 de la SEC ID Nº: 2 y en una realización de este aspecto de 15 la invención, el aminoácido en la posición 325 es un triptófano, una glutamina o una arginina.
- Una realización de la invención se refiere a una proteína quimérica, que comprende, consiste esencialmente en, o 20 consiste en, cualquiera de dos o más fragmentos como se describe en el presente documento. En un aspecto, la proteína quimérica comprende un fragmento N-terminal de ZnT8 y un fragmento C terminal de ZnT8. En otro aspecto, la proteína quimérica comprende dos fragmentos C-terminal de ZnT8, en el que cada uno de los fragmentos comprende la posición de aminoácido 325, y en la que cada uno de los fragmentos comprende un aminoácido diferente en la posición 325. En un aspecto, un fragmento comprende una arginina en la posición 325 y un segundo fragmento comprende un triptófano en la posición 325.
- Otra realización más de la invención se refiere a un fragmento u homólogo de ZnT8 que comprende al menos un epítopo de ZnT8 que está unido selectivamente por un anticuerpo anti-ZnT8. En un aspecto, el anticuerpo anti-ZnT8 es un anticuerpo obtenido de un individuo. En un aspecto, el individuo tiene, o se sospecha que tiene, diabetes de 25 tipo I.
- Otra realización de la invención se refiere al uso de un fragmento para diagnosticar a un individuo que es susceptible a, o que está desarrollando, una enfermedad autoinmunitaria, que comprende detectar anticuerpos que se unen selectivamente al fragmento de ZnT8 en una muestra de ensayo del individuo, en el que la detección del aumento de anticuerpos en el individuo, en comparación con un control negativo, indica que el individuo es susceptible a, o 30 está desarrollando, una enfermedad autoinmunitaria. En un aspecto, el método comprende detectar anticuerpos específicos para una proteína ZnT8 humana que comprende una arginina en la posición 325. En un aspecto, el método comprende detectar anticuerpos específicos para una ZnT8 humana, en la que el aminoácido en la posición 325 es una arginina, un triptófano y/o una glutamina.
- En cualquiera de los métodos descritos anteriormente, en un aspecto, la enfermedad autoinmunitaria es la diabetes 35 de tipo I.
- Otra realización de la invención se refiere a un método para controlar en un individuo la progresión de la diabetes autoinmunitaria de tipo I; a partir de una autorreactividad benigna inicial contra insulinitis destructora, que comprende detectar, en una muestra de ensayo del individuo, anticuerpos que se unen selectivamente al fragmento de ZnT8, en el que la detección del aumento de anticuerpos en el individuo, en comparación con una medición anterior de anticuerpos en el mismo individuo, indica que el individuo está progresando hacia insulinitis destructora. En un aspecto, el método comprende detectar anticuerpos que se unen selectivamente a la ZnT8 humana, en el que el aminoácido en la posición 325 es una arginina, un triptófano y/o una glutamina.
- Otra realización adicional de la invención se refiere a un método para controlar la eficacia de un tratamiento para 40 prevenir la diabetes de tipo I, retrasar la aparición de la diabetes de tipo I, o mejorar la autoinmunidad en individuos prediabéticos, que comprende detectar, en una muestra de ensayo del individuo, anticuerpos que se unen selectivamente a ZnT8, en el que la detección de una disminución del nivel de anticuerpos, o sustancialmente del mismo nivel, en el individuo, indica que el tratamiento es eficaz y en el que la detección del aumento de anticuerpos en el individuo, en comparación con una medición de anticuerpos anterior en el mismo individuo, indica que el tratamiento no es eficaz. En un aspecto, el método comprende detectar anticuerpos que se unen selectivamente a la ZnT8 humana, en la que el aminoácido en la posición 325 es una arginina, un triptófano y/o una glutamina.
- En un aspecto de cualquiera de los métodos de detección de anticuerpos descritos anteriormente, el método puede 45 incluir el uso de un ensayo que se selecciona, pero sin limitación, de: ensayo de radioinmunoprecipitación, ELISA, ensayo de inmunofluorescencia, ensayo de fluorescencia resuelta en tiempo, un ensayo de separación de células activadas por fluorescencia, ensayo competitivo con Europio y ensayo con luminiscencia.

Breve descripción de las figuras de la invención

La Figura 1 es un gráfico que muestra autoanticuerpos específicos de diabetes contra Slc30A8.

- Las Figuras 2A y 2B muestran la expresión y purificación de un autoantígeno de diabetes asociado a membrana en células S2 de *Drosophila*. La Figura 2A es una imagen digitalizada que muestra que la expresión de la construcción mIGRP V5 His se indujo en células S2 y que la fracción de la membrana celular (FMC) se transfirió con anticuerpo anti V5. La Figura 2B es un gráfico que muestra un ensayo de respuesta para hibridomas de células T IGRP-FMC (clon 1-76-54).
- La Figura 3 muestra la estructura del gen revisada para ZnT8 basada en la variación de secuencia EST y en los productos de traducción alternativos previstos. En lo que respecta a los productos de traducción alternativos representados, la secuencia de "inicio" de MYHCH corresponde a las posiciones 50-54 de la SEC ID Nº: 2 y la secuencia de "inicio" de MEFLER corresponde a las posiciones 1-6 de la SEC ID Nº: 2.
- La Figura 4A muestra la secuencia de aminoácidos de la ZnT8 humana (SEC ID Nº: 2), con los dominios transmembrana previstos resaltados en color gris oscuro.
- La Figura 4B muestra la topología de membrana prevista de ZnT8 y se muestran las posiciones de aminoácidos de los bucles.
- La Figura 5 ilustra el ensayo convencional para la sonda C-term de ZnT8.
- La Figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de un estudio DASP oculto con diferentes construcciones de ZnT8.
- La Figura 7 es un gráfico que demuestra que ZnT8 detecta autoanticuerpos en pacientes que son negativos para ICA y anticuerpos bioquímicos patrón de oro.
- Las Figuras 8A-8C son una serie de gráficos que muestran la relación de autoanticuerpos contra ZnT8 con respecto a insulina (Fig. 8A), GAD (Fig. 8B) e IA2 (Fig. 8C) en una población de nueva aparición.
- Las Figuras 9A-9D son una serie de gráficos que muestran la expresión de autoanticuerpos en el momento de aparición de la enfermedad con respecto a la edad (Fig. 9A = ZnT8; Fig. 9B = GAD; Fig. 9C = Insulina; Fig. 9D = IA2).
- Las Figuras 10A y 10B son gráficos que ilustran el uso de autoanticuerpos ZnT8 como un marcador predictivo de DT1 en dos pacientes diferentes, representados en las Figuras 10A y 10B, respectivamente.
- La Figura 11 es una tabla que muestra el estado de anticuerpos diabéticos de pacientes con DT1 en el momento de aparición de la enfermedad.
- Las Figuras 12A y 12B son gráficos que muestran características de operador receptor de los ensayos de anticuerpos de ZnT8 (la Fig. 12A muestra el índice de inmunoprecipitación y la Figura 12B muestra la sensibilidad).
- La Figura 13 es un gráfico que muestra relaciones entre reactividad contra ZnT8ORF, C-term y N-term.
- Las Figuras 14A y 14B muestran resultados de un experimento que investiga si el extremo N y el extremo C de ZnT8 pueden interaccionar para generar un nuevo epítopo; el experimento se realizó con suero de 2 grupos de diabéticos que se usaron como patrones en los ensayos de inmunoprecipitación, el primero seleccionado basados en una fuerte respuesta contra una sonda C-term (Fig. 14A), y el segundo basado en una reactividad N-terminal (Fig. 14B).
- La Figura 15A muestra las secuencias alineadas de la Slc30A8 murina (parte superior; se muestran las posiciones 267-367 de la SEC ID Nº: 4), de la Slc30A8 humana (centro; se muestran las posiciones 268 a 369 de la SEC ID Nº: 2) y de la Slc30A3 murina (parte inferior; la secuencia es la SEC ID Nº: 25).
- La Figura 15B es un gráfico que muestra el efecto de modificaciones en las sondas C-terminal con respecto a la reactividad de los autoanticuerpos (la secuencia de referencia que muestra los sitios de restricción está en las posiciones 336-369 de la SEC ID Nº: 2).
- La Figura 15C es un gráfico que muestra los efectos de sondas C-term con mutaciones puntuales en restos cargados (K340, H345 y E352) con respecto a la reactividad de autoanticuerpos.
- La Figura 16 muestra restos en el C-term de ZnT8 que son críticos para la autorreactividad.
- La Figura 17 muestra un mapeo epitópico usando mutantes de delección y quimeras de ratón/ser humano. La secuencia ZnT8 de ratón se muestra en las posiciones 267-367 de la SEC ID Nº: 4; la secuencia ZnT8 humana se muestra en las posiciones 268-369 de la SEC ID Nº: 2.
- La Figura 18 muestra un modelo molecular usado para estudios de mutagénesis dirigida.
- La Figura 19 muestra la conservación de restos de ZnT8 en las regiones dirigidas por anticuerpos D1T (la secuencia N-term Mse está en las posiciones 1-74 de la SEC ID Nº: 4; la secuencia N-term Hum está en las posiciones 1-75 de la SEC ID Nº: 2; la secuencia N-term Xen es la SEC ID Nº: 38; la secuencia C-term Mse está en las posiciones 267-367 de la SEC ID Nº: 4; la secuencia C-term Hum está en las posiciones 268-369 de la SEC ID Nº: 2; la secuencia C-term Xen es la SEC ID Nº: 39).
- La Figura 20 muestra la homología de secuencias entre los miembros de la familia de Slc30A humana.
- Las Figuras 21A-2C muestran que la mutagénesis dirigida a sitio de ZnT8 de ratón identifica epitopos principales en la estructura con respecto a respuestas de autoanticuerpos limitadas a CR (Fig. 21A), respuestas de anticuerpos limitadas a CW (Fig. 21B) y respuestas de autoanticuerpos a CQ (Figura 21C).
- Las Figuras 22A-22D muestran que la mutación multisitio de ZnT8 de ratón recapitula la reactividad de ZnT8 de ser humano (Fig. 22A = sonda mCArg con sueros reactivos a hCArg; Fig. 22B = mCArg (Arg Glu Lys Lys) con sueros reactivos a hCArg; Fig. 22C = sonda mCTrp con sueros reactivos a hCTrp; Fig. 22D = sonda mCArg (Arg Glu Lys Lys) con sueros reactivos a hCTrp).
- Las Figuras 23A-23D muestran la relación entre niveles de anticuerpos detectados por sondas polimórficas humanas y mutantes dirigidos al sitio de ratón (la Fig. 23A muestra el índice hC Arg-Gln frente al índice mC Arg; la Figura 23B muestra los índices mCArg, hCArg y hC Arg-Gln; la Figura 23C muestra el índice mC Trp frente al índice hC Trp-Gln; la Figura 23D muestra los índices mCTrp, hCTrp y hC Trp-Gln).

Las Figuras 24A-24D muestran la relación entre el polimorfismo de Slc30A8 del aa325 y ZnT8A. La Figura 24D muestra el nivel y la frecuencia de la respuesta segregada basada en la respuesta a sondas individuales o combinaciones de sondas. La Figura 24C muestra la relación entre las respuestas de las variantes de Arg y Trp comunes y se divide en 5 sectores basándose en un punto de corte de 95º percentil solo para respuestas Trp (vertical) y Arg (horizontal) y representando las diagonales las respuestas límite equivalentes \pm 3DT para ambas sondas, suponiendo un VC de 15 % en el ensayo. La Figura 24A y 24B usan la misma estratificación al examinar la relación entre las respuestas a la sonda Gln y a las sondas Arg y Trp.

La Figura 25 muestra la frecuencia de ZnT8A con respecto al genotipo que codifica el aa325.

La Figura 26 muestra la correlación entre el genotipo y la reactividad con las sondas hCR y hCW.

La Figura 27 muestra el genotipo Slc30A8 en relación con la edad de aparición de la diabetes.

Las Figs. 28A-B muestran el genotipo Slc30A8 frente a niveles de anticuerpo (la Fig. 28A muestra el nivel de reactividad del autoanticuerpo Slc30A8 con respecto al genotipo, la Fig. 28B muestra el nivel de otra reactividad de autoanticuerpo con respecto al genotipo).

La Figura 29 muestra un resumen de ensayos ZnT8 actuales.

La Figura 30 muestra la autorreactividad contra diferentes construcciones de ZnT8 combinando N-term, C-term, bucles luminales, bucles citosólicos y restos polimórficos.

Las Figs. 31A-31F muestran anticuerpos frente al péptido C, 0-2 años después de la aparición (Figs. 31A-C frente al péptido C; Figs. 31D-F frente a GADA e IA-2A).

La Figura 32A muestra niveles de ZnT8A y de péptido C 5-10 años después de la aparición

La Figura 33A ilustra el concepto como la probabilidad en la tasa de detención (negro con ZnT8; blanco sin ello).

La Figura 33B muestra el efecto diferencial de añadir la medición del anticuerpo ZnT8.

La Figura 34 es un gráfico que ilustra que la PCR en tiempo real de páncreas fetal humano muestra alta especificidad por islotes.

La Figura 35 muestra que pacientes con DT1 recientemente diagnosticados muestran respuestas de células T periféricas contra péptidos sintéticos de ZnT8.

La Figura 36 es un gráfico que muestra experimentos de presadsorción de autoanticuerpos que demuestran la utilidad de las proteínas recombinantes para diferenciar entre distintos epítopos de ZnT8.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en general a la identificación de dianas autoantigénicas, y particularmente, a dianas autoantigénicas en la diabetes autoinmunitaria de tipo I (DT1), y más particularmente, a la proteína ZnT8 como un nuevo autoantígeno, sobre el que se basan las herramientas y métodos terapéuticos, diagnósticos y pronósticos y que se describen en el presente documento. La invención también se refiere a la identificación de la variación genética en la proteína ZnT8 que se describe en el presente documento como protagonista importante en el inicio del proceso de la enfermedad y de la progresión de autoinmunidad a diabetes clínica. Estos hallazgos han permitido a los inventores proporcionar nuevas herramientas de diagnóstico que pueden usarse para perfilar la evaluación de pronóstico del ciclo de la enfermedad y para controlar la eficacia de las intervenciones terapéuticas en la fase preclínica de la enfermedad. La propia molécula, péptidos derivados, análogos peptídicos y reactivos inmunitarios secundarios también sirven como base de intervenciones terapéuticas para impedir la aparición o progresión de autoinmunidad contra la enfermedad clínica. La capacidad para determinar el genotipo de un individuo tan pronto como nace proporciona una ventaja exclusiva para implementar medidas terapéuticas, dado que la prevención de la aparición es probablemente más fácil que invertir el proceso autoinmunitario una vez que está establecido.

Previamente, como se ha indicado anteriormente, la insulina se definió como un gen candidato basándose en su asociación tisular, GAD65 e IA-2 a partir de la capacidad de inmunoprecipitar proteínas de islotes radiomarcados de suero de pacientes (64-66) e IGRP como un péptido unido a MHC H-2 K^d que estimula un clon de células T derivado de un ratón espontáneamente diabético. Los inventores se habían preguntado si podía desarrollarse una estrategia más sistemática para la identificación de autoantígenos diana basándose en lo que ahora se sabía de la biología celular y molecular de los autoantígenos, y en la disponibilidad de herramientas para estudiar y analizar la expresión de todo el genoma en diferentes tejidos por análisis de micromatriz. El objetivo fue crear un listado de genes candidatos que incluiría autoantígenos de la diabetes de importancia principal que pudiese posiblemente contar más de 50 proteínas de entre las 15.000 o también transcriptos de genes expresados en células B. Después pueden usarse ensayos contundentes para detectar respuestas inmunitarias celulares y humorales contra dichas moléculas.

Los resultados de esta investigación se describen más adelante, con énfasis particular sobre el descubrimiento de un nuevo autoantígeno diana, concretamente ZnT8.

Más específicamente, la biología estructural de la presentación antigénica y el reconocimiento de células T proporcionan relativamente pocas pistas para la identificación de nuevos autoantígenos de la DT1, dado que las moléculas receptoras tanto de MHC como de células T tienen amplios intervalos de especificidades de unión peptídica y afinidades relativamente bajas. Se ha demostrado que es difícil identificar epítopos nativos incluso cuando se tiene un conocimiento detallado de las propiedades de unión de péptidos mimotópicos, simplemente porque el número de restos de contacto es pequeño y las sustituciones conservativas de aminoácidos se aceptan fácilmente. Los autores de la presente invención describen en el presente documento el desarrollo de un algoritmo basado en el conocimiento para identificar autoantígenos candidatos en una base de todo el genoma. Diversos atributos primarios y secundarios de un autoantígeno "ideal" se asumen inicialmente basándose en la información

empírica y por consiguiente ponderada. La conformidad del antígeno con cada uno de los atributos ideales se pondera para deducir una "puntuación autoantigénica" y por tanto una lista ordenada de mejores candidatos. Un meta-análisis basado en funciones e información de ontología genética, tal como localización genética, se considera después antes de emprender una evaluación de una lista corta de candidatos basándose en respuestas 5 autoinmunitarias espontáneas y mediadas por células sensibilizadas en ratones NOD y autorreactividad humoral determinada en sueros tanto de seres humanos como de ratones NOD. Se han obtenido abundantemente los datos de micromatríz que afianzan esta estrategia. Por consiguiente, primero se exploran antígenos candidatos por análisis 10 serológicos en sujetos humanos y después se exploran alelos con susceptibilidad a diabetes en HLA-DR3, -DR4, DQ2 y -DQ8 HLA A2 y otro HLA de clase I en ratones transgénicos con respecto a respuestas inmunitarias mediadas por células contra antígenos candidatos.

Usando esta estrategia, los autores de la presente invención han identificado a la proteína transportadora de Cinc 8 (ZnT8, también conocida como Slc30A8) como una nueva diana autoantigénica para métodos pronósticos, diagnósticos y terapéuticos asociados con la T1D. La ZnT8 es una proteína que parece estar confinada a células β de los islotes productoras de insulina en seres humanos y en ratones. Los autores de la presente invención han demostrado que ZnT8 es una diana para autoanticuerpos en sujetos humanos que desarrollan DT1, y han 15 identificado variantes polimórficas de ZnT8 como marcadores genéticos de susceptibilidad a diabetes de tipo I, estado autoinmunitario, especificidad de autoanticuerpos y progresión y gravedad de la enfermedad. Los autoanticuerpos contra ZnT8 aparecen antes del desarrollo de la enfermedad clínica y se piensa que son un nuevo 20 marcador para la diabetes incipiente.

Además, los inventores han descubierto que los autoanticuerpos contra ZnT8 se dirigen a dos regiones diferentes de la molécula, y que una de estas regiones incorpora uno de 3 aminoácidos diferentes que desempeñan una función crucial en la determinación de la especificidad y magnitud de la respuesta inmunitaria. La determinación del genotipo 25 de un individuo usando un análisis de polimorfismo mononucleotídico en cualquier momento antes del desarrollo de autoinmunidad y diabetes proporciona información con respecto a que aminoácido variante codifica, y por lo tanto puede usarse para tomar decisiones clínicas con respecto al tratamiento y cuidados. Además, la presente invención permite el análisis exacto de la especificidad de los anticuerpos que se dirigen a ZnT8, y la clasificación adicional de los anticuerpos con respecto a cuales de las formas variantes de ZnT8 se dirigen por el sistema inmunitario. 30 Actualmente, se reconocen tres formas principales que dependen de la identidad del aminoácido variante en la posición 325 en la molécula (Arg, Trp o Gln), que en el presente documento se denominan "isoepítopos", y un cuarto epítopo que incorpora aminoácidos conservados (independiente del aa325). La respuesta del individuo puede categorizarse por ser una de 8 respuestas diferentes: (1) ninguna; (2) limitada a Arg325; (3) limitada a Trp325; (4) limitada a Gln325; (5) limitada a Arg325 y a Trp325; (6) limitada a Arg325 y a Gln325; (7) limitada a Trp325 y a 35 Gln325; y (8) independiente del aminoácido 325. Dicha estratificación de la respuesta del autoanticuerpo se propone en el presente documento para proporcionar información sobre la progresión de la enfermedad y será esencial para determinar como tratar la autoinmunidad de la DT1 con agentes terapéuticos específicos de antígeno.

Más específicamente, los inventores han mostrado que:

- el 60 % de pacientes con DT1 de nueva aparición son positivos para autoanticuerpos contra ZnT8;
- el 20-30 % de pacientes con DT1 son positivos para autoanticuerpos contra ZnT8 que son negativos para otros autoanticuerpos medido a través de medios bioquímicos (autoanticuerpos GAD, Ins e IA2) o histológicos (autoanticuerpos citoplasmáticos de los islotes);
- la identificación de autoanticuerpos contra ZnT8 cambia al 10 % de pacientes con DT1 de categoría de bajo riesgo (1 anterior) a alto riesgo (2 anterior);
- En un formato de ensayo sencillo con GAD, el ensayo anti-ZnT8 detecta el 90 % de pacientes con DT1 de nueva aparición;
- La presente invención permite la exploración de pacientes a gran escala;
- Los autoanticuerpos ZnT8 se dirigen a dos regiones diferentes de la molécula (el extremo N y el extremo C), incorporando la última uno de 3 aminoácidos diferentes que desempeña una función crucial en la determinación tanto de la calidad como de la magnitud de la respuesta inmunitaria;
- Los autoanticuerpos dirigidos a los sitios identificados anteriormente coinciden con la secuencia de los genes que codifica, y por tanto son realmente autorreactivos, y los alelos están presentes a una frecuencia alta (75 %), media (25 %) y baja (1 %) y muestran una variación significativa entre grupos raciales;
- Los niños pequeños que desarrollan diabetes antes de los 3 años tienen una frecuencia mayor de la esperada del genotipo CC (homocigoto para el genotipo Arg325) de ZnT8 (75 % frente a 55 %) y una menor frecuencia del genotipo CT (heterocigoto para el genotipo Arg325 y Trp 325) de ZnT8 (35 % frente a 40 %). Los niños más mayores muestran una frecuencia de genotipo similar a la indicada en la población normal. Por consiguiente, el genotipo CC puede considerarse que es un factor de riesgo para la diabetes. Antes de la presente invención, se identificó una secuencia de nucleótidos parcial que codifica una parte de ZnT8 y se describió en una publicación cuyo objetivo era la identificación de moléculas asociadas específicamente con las células beta pancreáticas, como un ARNm que se expresaba más altamente en células beta pancreáticas que en células alfa, riñón o hígado (Neophytou *et al.*, 1996, Diabetes 45: 127-133). Dos secuencias de nucleótidos parciales clonadas se depositaron en el GENBANK® con los números de Registro Z47772 (clon 23) y Z47779 (clon 41). Sin embargo, esta publicación no identificó ninguna secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de longitud completa para

ZnT8, ni tampoco esta publicación identifica o demuestra las secuencias parciales como que codifican un posible autoantígeno.

Toda la molécula ZnT8 se clonó originalmente en 2004 por un grupo en Suiza que trabaja principalmente sobre proteínas de transporte de iones metálicos pesados (véase Chimienti *et al.*, *Biometals* 2005 ago;18(4): 313-7; Chimienti *et al.*, *Diabetes* 2004 sep;53(9): 2330-7; y Seve *et al.*, *BMC Genomics* 2004 may 23; 5(1): 32, cada una de ellas incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad). A partir de una estrategia bioinformática e inmunohistoquímica, Chimienti *et al.* observaron que la molécula se expresaba en los islotes pancreáticos, y describieron su asociación con la glándula secretora de insulina. Además, Chimienti *et al.* explicaron que ZnT8 conduce a la acumulación de cinc en vesículas intracelulares cuando se sobreexpresa en células HeLa, y sugieren que ZnT8 es una ZnT implicada en la translocación del cinc citoplasmático en vesículas intracelulares. Sin embargo, no se hace ninguna mención en estos informes de que ZnT8 sea un posible autoantígeno y por consiguiente, no se menciona su uso en estrategias diagnósticas o terapéuticas tales como las descritas en el presente documento.

El reconocimiento por los presentes inventores de la función clave de ZnT8 como un autoantígeno en la diabetes de tipo 1 aparece a partir de una serie de recientes experimentos realizados en el laboratorio de los inventores que abordan específicamente la cuestión de si ZnT8 era una diana de autorreactividad humoral en pacientes diabéticos de tipo 1 de nueva aparición. Los estudios iniciales realizados por los inventores indicaron que aproximadamente el 10 % de los pacientes mostraban autorreactividad moderada contra ZnT8 (véanse los Ejemplos). Además el desarrollo del ensayo usando un fragmento COOH terminal (C-term) de la molécula en lugar de la ZnT8 de longitud completa (descrita más adelante) aumenta notablemente la sensibilidad del ensayo, de tal manera que hasta el 70 % de sujetos con DT1 dieron positivo a la aparición de enfermedad frente a menos del 1 % de controles correspondientes. Dicha sensibilidad es un buen ensayo, o mejor que los ensayos usados actualmente, para la autorreactividad humoral en sujetos con DT1, basados en las moléculas bien conocidas: insulina, ácido glutámico descarboxilasa (GAD65) e IA-2 (PTrN). Los inventores también han demostrado que ZnT8 es un marcador de enfermedad independiente y como tal, complementa y amplía la sensibilidad de los ensayos basados en anticuerpos. A través del examen de una serie de muestras recogidas durante 10 años, se mostró que los anticuerpos contra ZnT8 aparecen más tarde en el desarrollo de la prediabetes que otros anticuerpos, y esto puede por tanto indicar la fase final de insulitis destructora y por consiguiente, un marcador de enfermedad clínica incipiente.

Además, los inventores han descubierto que los autoanticuerpos ZnT8 se dirigen a dos regiones diferentes de la molécula, y que una de estas regiones incorpora uno de 3 aminoácidos diferentes que desempeñan una función crucial determinando tanto la calidad como la magnitud de la respuesta inmunitaria. Dado que la secuencia de aminoácidos variante se determina por la secuencia de nucleótidos del genoma, es por tanto posible determinar que aminoácido variante se codifica. Los inventores han demostrado por primera vez que los autoanticuerpos dirigidos a este sitio coinciden con la secuencia que codifica el gen y por tanto son verdaderamente autorreactivos. El gen muestra 3 alelos conocidos que están presentes a alta (75 %), media (25 %) y baja (1 %) frecuencia y muestran variación significativa entre grupos raciales. Esto tiene implicaciones en cuanto a cómo diagnosticar la autoinmunidad y a cómo dirigir medidas terapéuticas, dado que puede ser beneficioso o perjudicial dirigirse a la secuencia codificada correcta (propia) o errónea (no propia) dependiendo del resultado deseado. Por ejemplo, el objeto de la terapia inmunitaria puede ser la inducción de tolerancia inmunitaria, o a la inversa, la organización del sistema inmunitario a través de elementos de acoplamiento o delección respectivamente de elementos inmunitarios, tales como células T efectoras destructoras o células T reguladoras protectoras.

Antes de la presente invención, no había ninguna razón para sospechar *a priori* que la ZnT8 pudiera ser un autoantígeno reconocido bien por anticuerpos o por el brazo celular del sistema inmunitario. De hecho, que sepan los autores de la presente invención, la ZnT8 no se había investigado en el contexto de la diabetes autoinmunitaria y no hay otros datos publicados sobre la molécula en un contexto inmunológico. Como se ha indicado anteriormente, hay informes bibliográficos sobre el uso de autoantígenos como agentes diagnósticos y terapéuticos en otras enfermedades autoinmunitarias y en el contexto de la diabetes. Sin embargo, estos se dirigen a moléculas tales como insulina, glutamato descarboxilasa (GAD65), IA2, fogrina y la proteína de choque térmico 60, que no están relacionadas con ZnT8 desde un punto de vista estructural, de biología celular e inmunológico.

Además, aunque la identificación de diferencias de un solo aminoácido en una proteína o la modificación postraduccional de un solo aminoácido, por ejemplo, por fosforilación o citrulinación, no es inaudita, no hay ninguna razón para sospechar que dicho cambio fuese un determinante específico de especificidad de autoanticuerpos como han mostrado los autores de la presente invención. De hecho, los números del polimorfismo mononucleotídico (SNP) rs13266634 y rs16889462, que codifican cambios no sinónimos en la secuencia codificante de la ZnT8 humana, están publicados en la base de datos de polimorfismos mononucleotídicos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Este SNP codifica una Arg o un Trp alternativo en el aminoácido 325 en ZnT8 (SEC ID Nº: 2), que coincide con una variante polimórfica identificada en los estudios de los autores de la presente invención. Sin embargo, que sepan los autores de la presente invención, previamente no se ha identificado ninguna asociación de este SNP con la diabetes de tipo 1 (DT1). Un estudio de asociación de todo el genoma identificó a ZnT8 como que contenía diversos SNP que estaban asociados con la diabetes de tipo 2, incluyendo el rs13266634 indicado anteriormente (Sladek *et al.*, 2007, *Nature*. 22 feb 2007; 445(7130): 881-5. Epub 11 feb 2007), y recientemente se ha publicado un informe online de asociación de polimorfismo de ZnT8 con función de células beta (Staiger *et al.*, 2007,

PLoS ONE. 5 sep 2007; 2(9): e832). Sin embargo, que sepan los autores de la presente invención, la diabetes de tipo 2 no es una enfermedad autoinmunitaria, y previamente no se ha identificado ninguna asociación de este SNP con la diabetes de tipo 1. Además, los pacientes con diabetes de Tipo 2 no han mostrado presentar autoanticuerpos ZnT8.

5 En las secuencias de otros autoantígenos de la DT1, se han identificado variantes polimórficas, en concreto GAD65 e IA2; sin embargo, ninguna de estas se han visto implicadas en cambios en la autorreactividad de estos autoantígenos en la diabetes de tipo 1. En IA2 estas parecen ser un corte y empalme alternativo del ARNm que puede producirse de una manera específica de tejido y posiblemente de cómo resultado la evasión de la vigilancia inmunitaria. Sin embargo, esto no se equipara con el tipo de variación genética publicada en el presente documento por los autores de la presente invención, en concreto, un cambio de un solo aminoácido que se asocia con un reconocimiento específico de la molécula por un autoanticuerpo. Por lo tanto, este descubrimiento de los inventores no tiene precedentes. En el presente documento el descubrimiento describe que dos formas de ZnT8 codificadas por el polimorfismo común inducen respuestas inmunitarias cualitativamente diferentes y por consiguiente determinan el autoanticuerpo a un nuevo nivel. También indica que para dirigir componentes diferentes del sistema inmunitario pueden usarse diferentes formas de la molécula para realizar diferentes resultados inmunológicos.

10 Por consiguiente, los autores de la invención describen en el presente documento el uso de genes que codifican ZnT8, moléculas de ácido nucleico derivadas de los mismos, proteínas de ZnT8 o sus fragmentos codificados por dichos genes y moléculas de ácido nucleico, así como homólogos de dichos genes y proteínas y agentes relacionados (por ejemplo, anticuerpos, agonistas, antagonistas) y variantes polimórficas de ZnT8, y el uso o direcciónamiento de dichos genes, ácidos nucleicos, proteínas, homólogos, variantes y/o agentes relacionados y/o composiciones o formulaciones que comprenden los mismos, en el desarrollo de diversas herramientas diagnósticas y terapéuticas y ensayos. Dichas herramientas y ensayos se incluyen, sin limitación:

15 25 1. Ensayos en seres humanos y en animales experimentales para la detección de la autoinmunidad relacionada con la diabetes basados en respuestas de anticuerpos contra ZnT8, dominios específicos de la molécula y péptidos derivados de la proteína. Dichos ensayos se proporcionan en el formato de ensayos de radioinmunoprecipitación, ensayos ELISA, ensayos de fluorescencia y luminiscencia resuelta en tiempo, aunque la invención también incluye otros formatos. Dichos ensayos pueden usarse para:

20 30 35 a. predecir la susceptibilidad al desarrollo de la diabetes de tipo 1 en individuos y grupos de sujetos; b. controlar la progresión de autoinmunidad de una autorreactividad benigna inicial a insulitis destructiva; y/o c. controlar la eficacia de tratamientos dirigidos a la prevención o mejora de la autoinmunidad en el estado prediabético.

Dichos tratamientos pueden basarse en una serie de posibles agentes inmunosupresores incluyendo los diseñados en la propia molécula de ZnT8.

40 45 2. Ensayos de autoanticuerpos específicos de epítopo en seres humanos y en animales experimentales para la detección de la autoinmunidad relacionada con la diabetes basados en sondas dirigidas a las 3 formas variantes de ZnT8, y el uso de proteínas recombinantes que codifican las tres formas como agentes competitivos o bloqueantes. Dichos ensayos pueden estar en el formato de ensayos de radioinmunoprecipitación, ensayos ELISA, ensayos de fluorescencia y luminiscencia resuelta en tiempo, aunque la invención también incluye otros formatos. Dichos ensayos pueden usarse para:

50 55 a. predecir en general la susceptibilidad al desarrollo de la diabetes de tipo 1 en individuos y grupos de sujetos a partir de la frecuencia de anticuerpos, el nivel de respuesta, la titulación de los anticuerpos o la afinidad, la afinidad o clonalidad de la respuesta, como en el punto (1) anterior; b. determinar cuáles de los 3 epítopos están dirigidos en un individuo particular y cambios en la especificidad de la respuesta durante la enfermedad y el tratamiento, como una medida del progreso y respuesta a la terapia;

c. determinar la especificidad epitópica posiblemente diana de la respuesta inmunitaria mediante una combinación de genotipificación y por tanto determinar de antemano la mejor modalidad de tratamiento; y/o d. controlar la eficacia de tratamientos dirigidos a prevenir o mejorar la autoinmunidad en el estado prediabético.

Dichos tratamientos pueden basarse en una serie de posibles agentes inmunosupresores incluyendo los diseñados en la propia molécula de ZnT8.

60 65 3. Ensayos en seres humanos y en animales experimentales para la detección de la autoinmunidad relacionada con la diabetes basados en la reactividad de los linfocitos T contra la proteína y péptidos derivados usando respuestas linfocitarias proliferativas, reactivos tetraméricos de MHC de clase I y II y ensayos ELISPOT.

4. Anticuerpos marcados contra el antígeno y ensayos basados en la competición de los autoanticuerpos con los anticuerpos marcados como medio de ensayo.

5. Anticuerpos antiidiopáticos como un imitador para el ligando.

6. Agentes terapéuticos basados en antígeno, anticuerpos unidos al antígeno y/o antígeno o anticuerpos unidos a células.

7. Reactivos basados en ZnT8 para fines diagnósticos adicionales. Estos incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales contra la molécula, péptidos, peptidomiméticos y péptidos alterados que cuando se administran *in vivo*, pueden afectar al curso de la enfermedad, o que pueden usarse *ex vivo* para estimular células T a partir de un sujeto autoinmune para adoptar un fenotipo diferente y por tanto hacerse más toleragénico.
- 5 8. Reactivos inmunoterapéuticos específicos de antígeno basados en el epítopo peptídico afín o péptido alterado unidos a su molécula MHC junto con un agente que es tóxico a células T que se acoplarían con el complejo péptido/MHC, o un anticuerpo monoclonal que reconocería un péptido antigénico, o un imitador tal como una molécula distinta o una molécula formando complejos con otro componente molecular tal como un complejo péptido/MHC o complejo péptido/receptor de células T que actuaría como un agonista o antagonista de la interacción y señalización peptídica normal. Dependiendo del genotipo del individuo y de la especificidad epítópica de los anticuerpos prevalente en el momento, el agente terapéutico puede coincidir con la especificidad del anticuerpo, o no coincidir para estimular una respuesta inmunitaria alternativa.
- 10 9. El uso de la molécula ZnT8 como una proteína recombinante para modificar la respuesta del sistema inmunitario de una manera que sea protectora en lugar de destructora. Esto implica el uso de proteínas recombinantes, formas química o físicamente modificadas de la proteína, secuencias peptídicas derivadas de la proteína, péptidos y homólogos peptídicos química o físicamente modificados que podría usarse como una vacuna.
- 15 10. Generación de conjugados o combinación de moléculas efectoras con el péptido específico del epítopo de ZnT8 o con un reactivo (tal como una molécula pequeña o anticuerpo) para dirigir muy específicamente el proceso inmunitario que soporta la reacción autoinmunitaria. Esto se basa en el concepto de que, los anticuerpos son el producto de células B específicas, que también actúan como células presentadoras de antígeno a linfocitos T autorreactivos, que a su vez proporcionan señales para activar y occasionar la diferenciación de las células B.
- 20 11. Construcciones de ADNc basadas en el ARNm de ZnT8 humano y de ratón que incluye delecciones, construcciones químicas, mutaciones puntuales en uno solo sitio y en sitios múltiples para modificar la secuencia codificante, y el uso de dichas construcciones como reactivos diagnósticos o para estudiar la especificidad de la respuesta inmunitaria;
- 25 12. Proteínas de fusión y con etiquetas epítópicas, incluyendo secuencias de GFP, GST, NUS y de poli His, en vectores para la expresión de ZnT8 en células de mamífero, levadura y *E. coli*, y el uso de dichas construcciones como reactivos diagnósticos o para estudiar la especificidad de la respuesta inmunitaria.
- 30 13. Construcciones adenovirales para la transducción y expresión de ZnT8 en células de mamífero, incluyendo la variante polimórfica y las construcciones de proteína indicadora y con etiquetas epítópicas y el uso de dichas construcciones como reactivos diagnósticos o para estudiar la especificidad de la respuesta inmunitaria.
- 35 La Fig. 20 muestra una comparación de las diez variantes del gen de Slc30A que se reconocen en seres humanos, aunque una de estas (Slc30A9) probablemente no sea un homólogo verdadero dada su baja identidad y similitud de secuencia de aminoácidos (mostrada arriba entre paréntesis). Los congéneres más cercanos de ZnT8 son Slc30A2, una proteína lisosomal, Slc30A3 una proteína asociada con vesículas sinápticas y Slc30A4. Los anticuerpos suscitados contra Slc30A8 en conejos muestran alguna reactividad cruzada con Slc30A3, que suscita la posibilidad de que también podría producirse reactividad, o reactividad cruzada, en otras enfermedades autoinmunitarias humanas, como la esclerosis múltiple. Por el contrario, los autoanticuerpos Slc30A8 de diabéticos contra células T reactivas a Slc30A8 podrían también dirigirse a otros tejidos y contribuir a complicaciones de la diabetes. Por consiguiente, se piensa que las herramientas y métodos de la invención son útiles y aplicables a enfermedades autoinmunitarias distintas de la DTI, tales como, pero sin limitación, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad celiaca, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Addison, enfermedad de Graves y carditis reumática. El método de la invención es aplicable a cualquier enfermedad autoinmunitaria en la que Slc30A8 (ZnT8) o un homólogo es una diana o autoantígeno (autoanticuerpo o autoantígeno de célula T).
- 40 Además, los inventores han mostrado que, en algunos casos, los individuos con autoanticuerpos contra ZnT8 muestran reactividad contra otros miembros de la familia génica Slc30A que codifican otros transportadores de ZnT. Por ejemplo, los inventores muestran alguna reactividad contra ZnT8, que normalmente se considera una isoforma específica de neurona. Una implicación importante de este hallazgo es que dicha reactividad podría tener consecuencias patológicas en tejidos fuera del páncreas. Se sabe que la diabetes, especialmente la diabetes de tipo I, está asociada con neuropatía periférica, y que la reactividad cruzada de antígenos puede representar una relación entre estas afecciones. Por consiguiente, se piensa que las herramientas y métodos de la invención son útiles y aplicables a otras afecciones que están relacionadas por reactividad cruzada antigénica, incluyendo pero sin limitación, con neuropatía periférica.
- 45 50 Los aspectos de la invención demostrados en el presente documento incluyen las siguientes observaciones clínicas:
- 55 • Prediabetes:
- 60 - los autoanticuerpos de ZnT8 aparecen normalmente pronto, después de GADA e IAA junto con IA2A
 65 - no hay jerarquía de aparición estricta y ZnT8 puede preceder a la diabetes por 1-12 años

- Nueva aparición
 - ZnT8 aumenta en prevalencia después de 2-3 años de su aparición alcanzando un máximo de 60-80 % a los 16-18 años.
- 5 • Aparición posterior
 - ZnT8 disminuye después de aparecer con una semivida de 1 año posiblemente en paralelo con pérdida de masa de células B, medida por péptido C.
 - 10 - ZnT8 es menos persistente que GAD o IA2.
 - ZnT8 puede persistir en ausencia de péptido C medible y viceversa.

Ácidos nucleicos, proteínas, variantes polimórficas, homólogos, fragmentos, anticuerpos, y composiciones de ZnT8

15 *Gen de ZnT8, información estructural, secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos*

En una realización, la presente invención incluye el uso de un gen que codifica ZnT8, así como moléculas de ácido nucleico derivadas de o que comprenden al menos una parte de la región codificante y/o región reguladora de dicho gen, e incluyendo cualquier variante polimórfica de dicho gen. La presente invención también incluye el uso de cualquiera de las proteínas, homólogos o fragmentos de los mismos de ZnT8, incluyendo cualquier variante polimórfica de los mismos, o agonistas o antagonistas de los mismos, incluyendo los codificados por los genes o moléculas de ácido nucleico indicados anteriormente. Las nuevas proteínas y moléculas de ácido nucleico de ZnT8 (incluyendo diversos nuevos homólogos, variantes, fragmentos, proteínas de fusión y proteínas químéricas de ZnT8), así como agonistas y antagonistas de las mismas, se incluyen en la invención como composiciones de materia. La presente invención incluye adicionalmente anticuerpos de ZnT8, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y péptidos de unión a antígeno que son útiles en varios métodos en la presente invención.

30 La proteína 8 transportadora de cinc (ZnT8, también conocida como Slc30A8) es una proteína de 369 aminoácidos codificada por el gen de ZnT8. ZnT8 contiene seis dominios transmembrana y un bucle rico en histidina entre los dominios transmembrana IV y V, al igual que las otras proteínas ZnT (véase Chimienti *et al.*, 2004, *Diabetes*, citado anteriormente y la Fig. 4 mostrada en el presentada en este documento). Esta proteína se transcribe exclusivamente en el páncreas y más particularmente, se expresa solo en las células β de los islotes de Langerhans. Como describen Chimienti *et al.*, ya citado, el gen de ZnT8 se localiza en el cromosoma 8q24.11, contiene ocho exones, y abarca 37 kb. El ADNc y la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína ZnT-8 humana se proporciona en Chimienti *et al.*, ya citados, y esta publicación muestra la estructura génica, la localización cromosómica y el supuesto corte y empalme de la proteína ZnT8 humana (véase la Fig. 1A de Chimienti *et al.*, ya citado.). La secuencia de ADNc que codifica la ZnT8 humana y la secuencia de aminoácidos deducida se reflejan en la Fig. 1B de Chimienti *et al.*, ya citado, en la que también se indican los dominios transmembrana previstos de la ZnT8. La Fig. 40 1C de Chimienti *et al.*, ya citado, muestra una comparación de las secuencias de aminoácidos hsZnT-8, mmZnT-8 y rnZnT-8, indicándose los mismos restos por recuadros de color negro. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la ZnT8 humana se representa en este documento por la SEC ID Nº: 1. La SEC ID Nº: 1 codifica la proteína ZnT8 humana, cuya secuencia de aminoácidos se representa en este documento por la SEC ID Nº: 2. En la técnica 45 también se conoce la ZnT8 murina. La secuencia de ácido nucleico que codifica la ZnT8 murina se representa en este documento por la SEC ID Nº: 3. La SEC ID Nº: 3 codifica la proteína ZnT8 murina, cuya secuencia de aminoácidos se representa en este documento por la SEC ID Nº: 4. La secuencia de nucleótidos que codifica la ZnT8 humana también se describe en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con el Nº de Registro NM_173851 (gi: 64762488). La secuencia de aminoácidos de la ZnT8 humana también se encuentra en la base de datos del NCBI con el Nº de Registro NP_776250 (gi: 64762489). Las secuencias de 50 nucleótidos que codifican la ZnT8 de rata también se conocen. Toda la información contenida en los números de registro de las bases de datos y en las publicaciones a las que se hace referencia en el presente documento se incorporan en el mismo por referencia. Diversas variantes polimórficas, fragmentos, proteínas químéricas y proteínas de fusión de estas secuencias se describen en cualquier parte de este documento, y también se incluyen en la invención.

55 Chimienti *et al.*, ya citado, Figs. 3A-D, proporcionan descripción adicional del análisis estructural de ZnT8, incluyendo los dominios transmembrana previstos de ZnT8 y la localización del dominio rico en histidina, compartido entre otros miembros de la familia de ZnT (véase Chimienti *et al.*). Estos motivos estructurales están conservados en la ZnT8 de rata y de ratón. En la proteína ZnT8 humana, las histidinas conservadas aparecen en las posiciones 197, 203 y 205 con respecto a la SEC ID Nº: 2. En ratón, una histidina en la posición 196 de la SEC ID Nº: 4 se alinea con la His197 humana y una histidina en la posición 204 de la SEC ID Nº: 4 se alinea con la His205 humana. Por lo tanto, en el momento de la invención hubo una abundancia de información estructural y funcional disponible en lo que respecta a las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de ZnT8.

Homólogos, variantes, fragmentos y epítopenos de ZnT8 incluidos en la invención

La presente invención también incluye numerosas variantes (homólogos) de ZnT8 derivados sintéticamente y de origen natural, incluyendo polimorfismos nucleotídicos y aminoacídicos en el gen, proteínas codificadas por sitios de inicio alternativos y diversos fragmentos, proteínas de fusión y proteínas químéricas y las moléculas de ácido nucleico que codifican dichos fragmentos, proteínas de fusión y proteínas químéricas. Estos polinucleótidos y proteínas o péptidos son útiles en diversas aplicaciones diagnósticas, terapéuticas y de investigación de la invención, como se analiza más adelante.

- 10 En una realización de la presente invención, un homólogo o una variante de una proteína ZnT8 útil en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 45 %, o al menos aproximadamente 50 %, o al menos aproximadamente 55 %, o al menos aproximadamente 60 %, o al menos aproximadamente 65 %, o al menos aproximadamente 70 %, o al menos aproximadamente 75 %, o al menos aproximadamente 80 %, o al menos aproximadamente 85 %, o al menos aproximadamente 90 %, o al menos aproximadamente 95 % idéntica, o al menos aproximadamente 96 % idéntica, o al menos aproximadamente 97 % idéntica, o al menos aproximadamente 98 % idéntica, o al menos aproximadamente 99 % idéntica (o cualquier porcentaje de identidad entre 45 % y 99 %, en incrementos completos de número enteros) a la secuencia de aminoácidos de una proteína ZnT8 de tipo silvestre, y particularmente, la proteína ZnT8 humana descrita en el presente documento (véase análisis anterior).
- 15 20 En una realización, el homólogo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que es menos del 100 % idéntica, menos de aproximadamente 99 % idéntica, menos de aproximadamente 98 % idéntica, menos de aproximadamente 97 % idéntica, menos de aproximadamente 96 % idéntica, menos de aproximadamente 95 % idéntica, y así sucesivamente, en incrementos del 1 %, a menos de aproximadamente 70 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de origen natural de la proteína ZnT8.
- 25 La invención también incluye diversas variantes derivadas sintéticamente y de origen natural de ZnT8 que son proteínas codificadas por sitios de inicio alternativos, así como fragmentos (péptidos) de las mismas, proteínas de fusión o proteínas químéricas de las mismas que son útiles en cualquiera de los métodos diagnósticos, terapéuticos o de investigación descritos en este documento. Por ejemplo, una variante natural de la ZnT8 humana con un sitio de inicio alternativo se representa en este documento por la SEC ID Nº: 5. Esta proteína abarca desde la posición de aminoácido 50 a la 367 de la SEC ID Nº: 2. En lo referente a la Fig. 3, la estructura mostrada del gen la dedujeron los inventores a partir de alineamientos de secuencias EST publicadas y el gen. Sin embargo se diferencia del gen de 8 exones estructurado que se acepta como "normal". Específicamente, se evaluaron aproximadamente 210 secuencias EST, y se identificó una notable variación de sitios de corte y empalme, que puede conducir a posibles cambios en la expresión tisular, dado que la UTR 5' está alterada. En los casos en los que el exón 4 está cortado y empalmado, la secuencia sale de la fase de lectura y un transcripto truncado, normalmente MEFLERAYLVNDKAAKMYAFTLERRSCK* (SEC ID Nº: 6), aunque otra forma truncada, en la que la posición 7 es una treonina en lugar de una alanina, y en la que la posición 27 es una arginina en lugar de una cisteína, está representada por la SEC ID Nº: 7 (MEFLERTYLVNDKAAKMYAFTLERRSRK*). Parece que la Met cadena abajo
- 30 35 40 45 50 55 60 65
- puede usarse como un sitio de inicio alternativo dando como resultado el truncamiento del extremo NH₂ de la secuencia. Si esto ocurre de una manera específica de tejido, por ejemplo, en timo y no en páncreas, se produce entonces un epítopo críptico que puede estar dirigido por el sistema inmunitario. En el laboratorio de los autores de la presente invención se ha confirmado que eso se produce y que contribuye a la autorreactividad con otros autoantígenos relacionados con la diabetes, IA-2 e IGRP. El producto de traducción alternativo también podría presentarse al sistema inmunitario como un epítopo peptídico "extraño". Además, se han identificado variantes polimórficas naturales de la proteína ZnT8 de longitud completa, que incluyen, pero sin limitación, una sustitución de una histidina por la tirosina en la posición 18 de la SEC ID Nº: 2, una sustitución de una valina por la alanina en la posición 261 de la SEC ID Nº: 2, y una sustitución de un triptófano o una glutamina por la arginina en la posición 325 de la SEC ID Nº: 2. Las variantes polimórficas de ZnT8, particularmente en la posición 325, son de interés particular en la presente invención y se analizan con detalle más adelante. Las proteínas, variantes, fragmentos, proteínas químéricas y proteínas de fusión que comprenden dichos polimorfismos, y los nucleótidos que los codifican, se incluyen en la invención.
- En lo referente a las Figs. 4A y 4B, se predice que los extremos NH₂ y COOH se sitúen en el mismo lado de la membrana. El extremo N tiene una longitud de 74aa en el caso de la secuencia de referencia y de 25aa en el caso de las isoformas con el sitio de inicio alternativo. El extremo COOH de 94aa incorpora el determinante inmunológico humorral principal en la diabetes de tipo 1. Este epítopo es críptico en la molécula de longitud completa y se encuentra entre el aminoácido 268 y el 358 como se muestra mediante el efecto mínimo sobre la antigenicidad causada por la retirada de los últimos 15aa. Curiosamente, esta es una región que está fuertemente conservada entre los transportadores ZnT de especies diferentes. Por consiguiente, es posible que pueda generarse autorreactividad contra la proteína ZnT8 (exclusiva para las células B pancreáticas) y también por proteínas homólogas de organismos infecciosos. Una relación similar se ha observado con otro autoantígeno de la diabetes IA2 (trabajo no publicado). Este es un principio general, después puede suponerse que la autoinmunidad en la DT1 pudiese desencadenarse por una infección leve con un microorganismo con un transportador de Zn similar. Del mismo modo sería posible inmunizar con el epítopo definido del agente infeccioso. Un segundo epítopo más débil se localiza en el extremo N que no está conservado.

Los epítopos identificados parecen residir dentro de la célula, como es el caso de los autoantígenos IA2 y GAD65. En lo que respecta a la Fig. 4B, los bucles cortos en la parte superior de la figura (que incluyen las posiciones representadas por las posiciones 97-105; 164-168 y 239-252) estarían probablemente orientados hacia el lumen de los elementos celulares de la ruta secretora. Posiblemente esto incluiría el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, el gránulo secretor de insulina y finalmente el espacio extracelular. Es probable que estén expuestos en la superficie celular durante la exocitosis de gránulos de insulina normal durante la secreción normal o si la célula estuviese dañada de alguna manera. Por tanto, en el presente documento se incluyen anticuerpos contra péptidos que representan estos bucles para la detección de ZnT8, y por tanto servirían como un biomarcador que podría usarse para formar imágenes de la masa de células B *in vivo*, para determinar la actividad de la célula (más secreción igual a más exposición) y para controlar la generación de células β de otras fuentes tales como células madre y durante el desarrollo normal. Se propone un anticuerpo de la invención que se suscite contra la secuencia 2 del dominio luminal de la ZnT8 de ratón (posiciones 163-183 de la SEC ID Nº: 4, o ERLLYPDYQIQAGIMITVSGC) para aplicaciones de biología celular. Además se han fabricado anticuerpos contra el extremo C humano como una proteína de fusión con la glutatión S-transferasa (véase más adelante). Pueden producirse otros anticuerpos antipeptídicos contra secuencias en la región N terminal y C terminal usando las directrices proporcionadas en este documento. También puede prepararse la generación de anticuerpos anti-fosfopeptido.

Hay posibles sitios de fosforilación de la molécula en el segundo dominio intracelular y en el bucle C terminal. La fosforilación de estos sitios determinaría la localización de la molécula en la célula y su actividad como un transportador de Zn. Una nueva generación de agentes terapéuticos se dirige a proteína quinasas y por tanto puede ser posible modular la actividad de la proteína *in vivo* a través de la administración de fármacos.

El tercer bucle intracelular (representado como restos 196-215 de la SEC ID Nº: 2 en la Fig. 4B) es rico en restos de histidina (posiciones 197, 203 y 205 de la SEC ID Nº: 2) que puede ser importante en la unión de Zn y otros metales pesados. Esto podría ser parte del mecanismo mediante el cual la molécula transfiere Zn desde el citoplasma al lumen de compartimentos cubiertos con membrana que constituye la ruta secretora.

En una realización de la presente invención, los fragmentos de ZnT8 se incluyen para su uso en métodos diagnósticos y terapéuticos, o para la generación de anticuerpos. De acuerdo con la presente invención, el tamaño mínimo de una proteína ZnT8, parte de una proteína (por ejemplo, un fragmento, parte, dominio, etc.), o región o epítopo de una proteína, tiene un tamaño suficiente para servir como un epítopo o superficie de unión conservada para la generación de un anticuerpo o como una diana en un ensayo *in vitro*. En una realización, una proteína de la presente invención tiene una longitud de al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos (por ejemplo, adecuada para un epítopo de anticuerpo o como un péptido detectable en un ensayo), o al menos una longitud de al menos aproximadamente 25 aminoácidos, o al menos una longitud de aproximadamente 50 aminoácidos, o al menos una longitud de aproximadamente 100 aminoácidos, o al menos aproximadamente una longitud de 150 aminoácidos, y así sucesivamente, en cualquier longitud entre 4 aminoácidos y hasta la longitud completa de una proteína ZnT8 o parte de la misma o más larga, en números enteros completos (por ejemplo, 8, 9, 10,...25, 26,...300, 301,...). La invención incluye, cualquier fragmento N-terminal, fragmento C-terminal, quimera de los mismos o fragmento de delección de cualquier longitud, con respecto a la proteína ZnT8 de cualquier especie, prefiriéndose la ZnT8 humana, e incluyendo cualquiera de las formas polimórficas de la misma. La Tabla 1 y las Figs. 15-19, 21 y 25, por ejemplo, describen información adicional con respecto a la localización de epítopos e isoepítopos de ZnT8, incluyendo la identificación de restos en el extremo C que son críticos para la autorreactividad. Esta información permite diseñar, producir y usar varios fragmentos y homólogos de ZnT8 en cualquiera de los métodos diagnósticos, pronósticos y terapéuticos descritos en el presente documento.

Como se ha indicado anteriormente, las Figs. 4A y 4B muestran los dominios transmembrana previstos de la proteína ZnT8. Estos dominios plantean un problema en el diseño de ensayos ya que normalmente están rodeados por un lípido y por otra parte son muy cohesivos, de tal manera que la proteína o se precipita o no se pliega. Dichas regiones pueden ser dianas para células T, y por consiguiente se incluyen para su uso en fragmentos de acuerdo con la invención, pero es poco probable que sean dianas para antígenos. La secuencia de longitud completa muestra reactividad contra anticuerpos circulantes y aún más en diabéticos que en controles. Sin embargo el ensayo solo detecta el 10-20 % de individuos con enfermedad de aparición reciente, por consiguiente, los inventores han proporcionado sondas alternativas, concretamente sondas del extremo N, extremo C y del bucle de unión a Zn como se indica más adelante.

Un fragmento particularmente preferido de una proteína ZnT8 útil en la presente invención es cualquier fragmento N-terminal o C-terminal de ZnT8, prefiriéndose particularmente fragmentos C-terminales. Otro fragmento preferido de ZnT8 es una mezcla o híbrido (quimera) de fragmentos N y C terminales de ZnT8. Los fragmentos particularmente preferidos de ZnT8 comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, cualquier fragmento C-terminal de aproximadamente los 110 restos C-terminales a aproximadamente los 8 restos C-terminales de la ZnT8 humana. Los fragmentos C-terminales particularmente preferidos incluyen los restos 101 y 102 C-terminales de la ZnT8 humana.

En la Tabla I indicada a continuación se ilustran diversas proteínas, variantes, proteínas químéricas y fragmentos que pueden usarse en diversas realizaciones de la presente invención. Cualquiera de estas proteínas, variantes,

proteínas químéricas, o fragmentos pueden anexarse con uno, dos o más restos de aminoácidos (por ejemplo, una metionina en el extremo N del fragmento, como se muestra para los fragmentos C terminales mostrados más adelante). Además, dado el suministro de estas construcciones y la información proporcionada en los Ejemplos, un experto en la técnica podrá producir fácilmente otras construcciones en las que se delejen aminoácidos adicionales, en las que los dominios de una quimera tengan un orden invertido, o en las que dos o más fragmentos o partes de los mismos, descritos en el presente documento, se combinen para producir otras proteínas químéricas.

Tabla 1

10	<u>Sonda N3 (fragmento N-term) aa1-74 de SEC ID Nº: 2 Mr=8576 pl=6.72</u> MEFLERTYLVNDKAAKMYAFTLESVELQQKPVNKDQCPRERPEELESGGMYHCHSGSKPTEKGANEYAYAKWKL (SEC ID Nº: 8) <u>Sonda C4 (fragmento C-term) aa268-369 de SEC ID Nº: 2 Mr 11235 PI=4.95</u> MKDFSIILLMEGVPKSLNYSGVKELAVDGVLSVHSLHIWSLTMNQVILSAHVATAASRDSQRREIAKALSKSFTM HSLTIQMESPVDQDPDCLFCEDPCD (SEC ID Nº: 9) <u>Sonda 1 C-terminal truncada (activa en ensayos descritos en el presente documento)</u> MKDFSIILLMEGVPKSLNYSGVKELAVDGVLSVHSLHIWSLTMNQVILSAHVATAASRDSQRREIAKALSKSFTM HSLTIQMESP (SEC ID Nº: 10) <u>Sonda 2 C-terminal truncada (inactiva en ensayos descritos en el presente documento)</u>
15	MKDFSIILLMEGVPKSLNYSGVKELAVDGVLSVHSLHIWSLTMNQVILSAHVATAASRDSQRREIAKALSKSFTM HSLTIQMESPVDQDPDCLFCEDPCD (SEC ID Nº: 11) <u>Sonda C-terminal mutante (actividad reducida en ensayos descritos en el presente documento)</u> MKDFSIILLMEGVPKSLNYSGVKELAVDGVLSVHSLHIWSLTMNQVILSAHVATAASRDSQRREIAKALSKSFTM ASLTIQMAAPVDQDPDCLFCEDPCD (SEC ID Nº: 12)
20	<u>Bucle de Unión a Cinc</u> VLT V LHQRC L GH N KEVQANASVRA (SEC ID Nº: 13) <u>Sonda M275 aa275-369 de SEC ID Nº: 2 Mr 10414 PI=5.21</u> MEGVPKSLNY SGVKELILAV DGVLSVHSL IWSLTMNQVI LSAHVATAAS RDSQVVRREI AKALSKSFTM HSLTIQMESP VDQDPDCLFC EDPCD (SEC ID Nº: 14) <u>Sonda M282 aa283-369 de SEC ID Nº: 2 Mr 9703 PI=5.15</u>
25	MNYSGVKELI LAVDGVLSVH SLHIWSLT MNQVILSAHV ATAASRDSQV VRREIAKALS KSFTMHSLTI QMESPVDQDP DCLFCEDPCD (SEC ID Nº: 15) <u>Sonda M282 aa290-369 de SEC ID Nº: 2 Mr 8699 PI=5.08</u> MILAVDGVLS VHSLHIWSLT MNQVILSAHV ATAASRDSQV VRREIAKALS KSFTMHSLTI QMESPVDQDP DCLFCEDPCD (SEC ID Nº: 16) <u>Sonda M300 aa300-369 de SEC ID Nº: 2 Mr 7845 PI=5.50</u>
30	MHSLHISLT MNQVILSAHV ATAASRDSQV VRREIAKALS KSFTMHSLTI QMESPVDQDP DCLFCEDPCD (SEC ID Nº: 17) <u>Sonda M305 aa300-369 de SEC ID Nº: 2 Mr 7257 PI=4.74</u>
35	MWSLTMNQVI LSAHVATAAS RDSQVVRREI AKALSKSFTM HSLTIQMESP VDQDPDCLFC EDPCD (SEC ID Nº: 18) <u>Sonda C4 Δaa293-369 de SEC ID Nº: 2 Mr 2827 PI=4.68 (corte Sall)</u> MDFSILLMEG VPKSLNYSGV KELILA (SEC ID Nº: 19) <u>Sonda C4 Δaa325-369 de SEC ID Nº: 2 Mr 6109 PI=6.13 (corte Hpall)</u>
40	MDFSILLMEG VPKSLNYSGV KELILAVDGV LSVHSLHIWS LTMNQVILSA HVATAAS (SEC ID Nº: 20) <u>Sonda C4 Δaa344-369 de SEC ID Nº: 2 Mr 8282 PI=8.87 (corte Hphl)</u> MDFSILLMEG VPKSLNYSGV KELILAVDGV LSVHSLHIWS LTMNQVILSA HVATAASRDS QVVRREIAKA LSKSFT (SEC ID Nº: 21) <u>Sonda C4 Δaa351-369 de SEC ID Nº: 2 Mr 9093 PI=8.87 (corte BstXI)</u>
45	MDFSILLMEG VPKSLNYSGV KELILAVDGV LSVHSLHIWS LTMNQVILSA HVATAASRDS QVVRREIAKA LSKSFTMHS TIQMESPVDQ DPDCLFCEDP CD (SEC ID Nº: 22) <u>Sonda C4 Δaa357-369 de SEC ID Nº: 2 Mr 9752 PI=6.86 (corte BstNI)</u> MDFSILLMEG VPKSLNYSGV KELILAVDGV LSVHSLHIWS LTMNQVILSA HVATAASRDS QVVRREIAKA LSKSFTMHS TIQMESPVD (SEC ID Nº: 23)
50	<u>C4 tipo Silvestre aa268-369 de SEC ID Nº: 2 Mr 11235 PI=4.95 (mutantes subrayados)</u> MDFSILLMEG VPKSLNYSGV KELILAVDGV LSVHSLHIWS LTMNQVILSA HVATAASRDS QVVRREIAKA LSKSFTMHS TIQMESPVDQ DPDCLFCEDP CD (SEC ID Nº: 24) <u>Sondas mutantes C4 adicionales (SEC ID Nº: 9 con mutaciones relevantes en las posiciones de la SEC ID Nº: 2):</u>
55	K340A; Mr=11177 pl=4.74 H345A; Mr=11168 pl=4.74 E352A; Mr=11176 pl=5.17 S353A; Mr=11218 pl=4.95 S353D; Mr=11262 pl=4.77 K340A, H345A, E345A triple; Mr=11053 pl=4.67
60	
65	

Variantes de secuencias de aminoácidos de ZnT8 de ratón

mSLC30aR C-term Met266, Gln324

**MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VH VATAASQD SQSVRTGIAQ
ALSSFDLHSL TIQIESAADQ DPSCLLCEDP QD (SEC ID Nº: 40)**

5 mSLC30a8 C-term Met266, Arg324

**MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VH VATAASRD SQSVRTGIAQ
ALSSFDLHSL TIQIESAADQ DPSCLLCEDP QD (SEC ID Nº: 41)**

10 mSLC30a8 C-term Met266, Trp324

**MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VH VATAASWD SQSVRTGIAQ
ALSSFDLHSL TIQIESAADQ DPSCLLCEDP QD (SEC ID Nº: 42)**

15 mSLC30a8 C-term Met266, Lys339(inserto)

**MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VH VATAASQD SQSVRTGIAQ
ALSKSFDLHS LTIQIESAAD QDPSCLLCED PQD (SEC ID Nº: 43)**

20 mSLC30a8 C-term Met266, Arg324, Lys339(inserto)

**MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VH VATAASRD SQSVRTGIAQ
ALSKSFDLHS LTIQIESAAD QDPSCLLCED PQD (SEC ID Nº: 44)**

25 mSLC30a8 C-term Met266, Trp324, Lys339(inserto)

**MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VH VATAASWD SQSVRTGIAQ
ALSKSFDLHS LTIQIESAAD QDPSCLLCED PQD (SEC ID Nº: 45)**

30 mutante REKK Met266 TGIAQALS331-338>REIAKALKS332-340

**MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VH VATAASQD SQVRREIAK
ALSKSFDLHS LTIQIESAAD QDPSCLLCED PQD (SEC ID Nº: 46)**

35 mutante RREKK Met266 (R325: TGIAQALS331-338 > REIAKALKS332-340)

**MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VH VATAASRD SQVRREIAK
ALSKSFDLHS LTIQIESAAD QDPSCLLCED PQD (SEC ID Nº: 47)**

40 Mutante WREKK Met266 (R325: TGIAQALS331-338 > REIAKALKS332-340)

**MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VH VATAASWD SQVRREIAK
ALSKSFDLHS LTIQIESAAD QDPSCLLCED PQD (SEC ID Nº: 48)**

Variantes de secuencias de aminoácidos de la ZnT8 humana

45 hSLC30a8 C-term 267Met, 325Arg

**MKDFSILLME GVPKSLNYSG VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AH VATAASRD SQVVRREIAK
ALSKSFTMHS LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCD (SEC ID Nº: 49)**

50 hSLC30a8 C-term 267Met, 325Gln

**MKDFSILLME GVPKSLNYSG VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AH VATAASQD SQVVRREIAK
ALSKSFTMHS LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCD (SEC ID Nº: 50)**

55 hSLC30a8 C-term 267Met, 325Trp

**MKDFSILLME GVPKSLNYSG VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AH VATAASWD SQVVRREIAK
ALSKSFTMHS LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCD (SEC ID Nº: 51)**

60 hSLC30A8 secuencia conectora

PSTPPGSSGG G (SEC ID Nº: 52)

dímero C-term hSLC30a8 1Met, 59Arg. conector. 172Arg (Posiciones 59 y 172 correspondientes al aa325 en tipo silvestre).

**MKDFSILLME GVPKSLNYSG VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AH VATAASRD SQVVRREIAK
ALSKSFTMHS LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL LMEGVPKSLN YSGVKELILA
65 VDGVL SVHSL HIWSLT MNQV ILSAHVATAA SRDSQV VRRE IAKAL SKSFT MHS LTIQ MES PVDQDPDCLF
CEDPCD (SEC ID Nº: 53)**

dímero C-term hSLC30a8 1Met, 59Arg. conector. 172Gln

**MKDFSILLME GVPKSLNYSG VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AH VATAASRD SQVVRREIAK
ALSKSFTMHS LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL LMEGVPKSLN YSGVKELILA
70 VDGVL SVHSL HIWSLT MNQV ILSAHVATAA SQDSQV VRRE IAKAL SKSFT MHS LTIQ MES PVDQDPDCLF
CEDPCD (SEC ID Nº: 54)**

dímero C-term hSLC30a8 1 Met. 59Arg. conector. 172Trp

**MKDFSILLME GVPKSLNYSG VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AH VATAASRD SQVVRREIAK
ALSKSFTMHS LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL LMEGVPKSLN YSGVKELILA
75 VDGVL SVHSL HIWSLT MNQV ILSAHVATAA SWDSQV VRRE IAKAL SKSFT MHS LTIQ MES PVDQDPDCLF
CEDPCD (SEC ID Nº: 55)**

dímero C-term hSLC30a8 1 Met. 59Gln. conector. 172Gln

**MKDFSILLME GVPKSLNYSG VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AH VATAASQD SQVVRREIAK
ALSKSFTMHS LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL LMEGVPKSLN YSGVKELILA
80 VDGVL SVHSL HIWSLT MNQV ILSAHVATAA SQDSQV VRRE IAKAL SKSFT MHS LTIQ MES PVDQDPDCLF
CEDPCD (SEC ID Nº: 56)**

dímero C-term hSLC30a8 1 Met. 59Gln. conector. 172Arg

**MKDFSILLME GVPKSLNYSG VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AH VATAASQD SQVVRREIAK
ALSKSFTMHS LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL LMEGVPKSLN YSGVKELILA
85 VDGVL SVHSL HIWSLT MNQV ILSAHVATAA SRDSQV VRRE IAKAL SKSFT MHS LTIQ MES PVDQDPDCLF
CEDPCD (SEC ID Nº: 57)**

dímero C-term hSLC30a8 1Met, 59Gln. conector. 172Trp (Posiciones 59 y 172 correspondientes a aa325 en tipo silvestre)

MKDFSILLME GVPKSLNYSG VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASQD SQVVRREIAK ALSKSFTMHS LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL LMEGVPKSLN YSGVKELILA VDGVLVHSL HIWSLTMNQV ILSAHVATAA SQDSWVVRRE IAKALSKSFT MHSLTIQMES PVDQDPDCLF CEDPCD (SEC ID Nº: 58)

dímero C-term hSLC30a8 1 Met. 59Trp. conector. 172Trp

MKDFSILLME GVPKSLNYSG VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASWD SQVVRREIAK ALSKSFTMHS LTIQMESPVD LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL LMEGVPKSLN YSGVKELILA VDGVLVHSL HIWSLTMNQV ILSAHVATAA SWDSQVVRRE IAKALSKSFT MHSLTIQMES PVDQDPDCLF CEDPCD (SEC ID Nº: 59)

dímero C-term hSLC30a8 1 Met. 59Trp. conector. 172Arg

MKDFSILLME GVPKSLNYSG VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASWD SQVVRREIAK ALSKSFTMHS LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL LMEGVPKSLN YSGVKELILA VDGVLVHSL HIWSLTMNQV ILSAHVATAA SRDSQVVRRE IAKALSKSFT MHSLTIQMES PVDQDPDCLF CEDPCD (SEC ID Nº: 60)

dímero C-term hSLC30a8 1 Met. 59Trn. conector. 172Gln

MKDFSILLME GVPKSLNYSG VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASWD SQVVRREIAK ALSKSFTMHS LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL LMEGVPKSLN YSGVKELILA VDGVLVHSL HIWSLTMNQV ILSAHVATAA SQDSQVVRRE IAKALSKSFT MHSLTIQMES PVDQDPDCLF CEDPCD (SEC ID Nº: 61)

variante Trp325 de tipo silvestre fusión N-term / C-term hSLC30a8

Variantes de secuencias de aminoácidos de la ZnT8 humana

MEFLERTYLV NDKAAKMYAF TLESVELQQK PVNKDQCPRE RPEELESGGM YHCHSGSKPT EKGANEYAYA KWKLCSGGGK DFSILLMEGV PKSLNYSVGK ELILAVDGVL SVHSLHIWLS TMNQVILSAH VATAAS_WDSQ VVRREIAKAL SKSFTMHSLT IQMESPVQDQ PDCLFCEDPC D (SEC ID Nº: 62)

variante Arn325 de tipo silvestre fusión N-term / C-term hSLC30a8

MEFLERTYLV NDKAAKMYAF TLESVELQQK PVNKDQCPRE RPEELESGGM YHCHSGSKPT EKGANEYAYA KWKLCSGGGK DFSILLMEGV PKSLNYSVGK ELILAVDGVL SVHSLHIWLS TMNQVILSAH VATAAS_RDSQ VVRREIAKAL SKSFTMHSLT IQMESPVQDQ PDCLFCEDPC D (SEC ID Nº: 63)

codón de inicio alternativo/variante Trp325 de tipo silvestre fusión N-term / C-term hSLC30a8

MYHCHSGSKP TEKGANEYAY AKWKLCSGGG KDFSILLMEG VPKSLNYSVG KELILAVDGVL LSVHSLHIWS LTMNQVILSA HVATAAS_WDS QVVRREIAKA LSKSFTMHSL TIQMESPVDQ DPDCLFCEDP CD (SEC ID Nº: 64)

codón de inicio alternativo/variante Arg325 de tipo silvestre fusión N-term / C-term de hSLC30a8

MYHCHSGSKP TEKGANEYAY AKWKLCSGGG KDFSILLMEG VPKSLNYSVG KELILAVDGVL LSVHSLHIWS LTMNQVILSA HVATAAS_RDS QVVRREIAKA LSKSFTMHSL TIQMESPVDQ DPDCLFCEDP CD (SEC ID Nº: 65)

variante Arg325 de tipo silvestre fusión C-term / N-term hSLC30a8

MKDFSILLME GVPKSLNYSG VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASRD SQVVRREIAK ALSKSFTMHS LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCDDGGGMEFL ERTYLVNDKA AKMYAFTLES VELQQKPVNK

DQCPRERPEE LESGGMYHCH SGSKPTEKGA NEYAYAKWKL CS (SEC ID Nº: 66)

secuencia hSLC30a8 sin segmentos TM variante Trp325

MEFLERTYLV NDKAAKMYAF TLESVELQQK PVNKDQCPRE RPEELESGGM YHCHSGSKPT EKGANEYAYA KWKLCSASDA AHLLIDSSKP PSKRLTFGW RAECERLLYP DYQIQATLHQ RCLGHNHKEV QANASVRKPE YKKDFSILLM EGVPKSLNYS GVKELILAVD GVLVHSLHI WSLTMNQVIL SAHVATAASW DSQWRREIA KALSKSFTMH SLTIQMESPV DQDPDCLFCE DPCD (SEC ID Nº: 67)

Los inventores diseñaron las secuencias indicadas en la Tabla 1 para ensayar diversas características de autorreactividad del paciente, y para diseñar ensayos que o discriminan mejor entre pacientes, o por el contrario, son pan-reactivos. El siguiente listado muestra cómo los inventores han categorizado las secuencias descritas anteriormente con respecto a la autorreactividad del paciente (muestras de suero del paciente). La referencia a una secuencia que no está entre paréntesis indica la identificación de la reactividad del paciente hacia la construcción que comprende esa secuencia; las secuencias mostradas entre paréntesis indican actividad reducida o actividad variable que es probablemente el producto de otras especificidades que aún no se han definido. La ausencia de identificación de un número de secuencia con respecto a un tipo de muestra particular indica ausencia de reactividad. En el caso de reactividad restringida a Gln325, la información está limitada ya que hasta ahora solo se ha identificado suero de un paciente de más de 500 que se han ensayado.

- Muestras reactivas a N-term: SEC ID Nº: 8, 63, 64, 65
- Reactividad restringida a Arg325: SEC ID Nº: 9, 10, (11), (12), 14, 15, (16 a 21), (22), 23, (24 a 30), (40), 41, (42), (43), 44, 47, 49, (52), 53, 54, 55, 57, 60, 63, 65
- Reactividad restringida a Trp325: SEC ID Nº: (40), (41), 42, (43), 45, 48, 51, (52), 55, 58, 59, 60, 61, 62, 64
- Reactividad limitada a Gln325: SEC ID Nº: 40, (41), (42), 50
- Aminoácido 325 independiente: SEC ID Nº: 9 a 16, (17 a 21), 22, 23, 24, (25 a 30), (40, 41), 42, (43), 47 a 51, (52), 53 a 65

La presente invención también incluye proteínas ZnT8 que comprenden, consisten esencialmente en, o constan de un péptido antigénico o epítopo de células T (también denominado como un péptido de unión al complejo de histocompatibilidad mayor (MHC)). Dicho péptido incluye cualquier péptido que sea capaz de unirse a una proteína MHC de tal manera que el complejo MHC-péptido puede unirse a un receptor de células T (TcR) y por esta razón, en una realización preferida, se induce una respuesta de células T (por ejemplo, una respuesta estimuladora o toleragénica, descrita más adelante). Un péptido de unión al MHC que se une a una molécula de MHC y que es reconocido, junto con la molécula MHC, por un receptor de células T, se considera que es un péptido antigénico. En la naturaleza, los péptidos que se producen por hidrólisis de antígenos se someten a hidrólisis antes de unir el antígeno con una proteína del MHC. Las proteínas del MHC de clase I normalmente presentan péptidos antigenicos derivados de proteínas activamente sintetizadas en el citoplasma de la célula. Por otro lado, las proteínas del MHC de clase II normalmente presentan péptidos antigenicos derivados de proteínas exógenas que entran en una ruta endocítica de la célula o de proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático (RE). El tránsito intracelular permite que un péptido antigenico comience a asociarse con una proteína del MHC. El complejo resultante MHC-péptido se desplaza después a la superficie de la célula donde está disponible para la interacción con un TcR.

La unión de un péptido con un surco de unión al péptido del MHC puede controlar la disposición espacial del MHC y/o de los restos de aminoácidos peptídicos reconocidos por un TcR. Dicho control espacial se debe en parte a los enlaces de hidrógeno formados entre un péptido y una proteína del MHC. Preferentemente, la longitud del epítopo de células T es de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 restos de aminoácidos, más preferentemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 30 restos de aminoácidos, e incluso más preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 restos de aminoácidos, e incluso más preferentemente entre aproximadamente 9 y 11 restos de aminoácidos, incluyendo cualquier péptido de tamaño entre 5 y 40 aminoácidos de longitud, en incrementos de números enteros completos (es decir, 5, 6, 7, 8, 9...40). Aunque los péptidos unidos al MHC de Clase II de origen natural varían de aproximadamente 9-40 aminoácidos, en casi todos los casos el péptido puede estar truncado en un núcleo de entre 9-11 aminoácidos sin perder la actividad de unión al MHC o el reconocimiento de células T.

Definiciones generales y realizaciones relacionadas con polinucleótidos y proteínas o péptidos

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos e inmunología, bien conocidas por los expertos en la materia. Dichas técnicas se explican por completo en la bibliografía, tal como, Methods of Enzymology, Vol. 194, Guthrie *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989) and Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición (Sambrook y Russel, 2001), (denominados conjuntamente en el presente documento "Sambrook"); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987, incluyendo suplementos a lo largo del 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, eds., 1994); Harlow y Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York; Harlow y Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (denominados conjuntamente en el presente documento "Harlow y Lane"), Beaucage *et al.* eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley y Sons, Inc., Nueva York, 2000).

De acuerdo con la presente invención, un polinucleótido aislado (al que también se hace referencia como una molécula de ácido nucleico aislada) es una molécula de ácido nucleico que no se ha eliminado de su medio natural (por ejemplo, que se ha sometido a manipulación humana), siendo su medio natural el genoma o cromosoma en el que se encuentra la molécula de ácido nucleico en la naturaleza. Como tal, la expresión "aislada" no refleja necesariamente el grado al cual se ha purificado la molécula de ácido nucleico, pero indica que la molécula no incluye un genoma completo o un cromosoma completo en el que la molécula de ácido nucleico se encuentra en la naturaleza. Los polinucleótidos útiles en la presente invención son normalmente una parte de un gen (cadena en sentido o no en sentido) de la presente invención que es idónea para su uso como una sonda de hibridación o cebador de PCR para la identificación de un gen (o parte del mismo) de longitud completa, en una muestra determinada, o que es idónea para codificar una proteína ZnT8 o fragmento de la misma, o que es idónea como un reactivo terapéutico (por ejemplo, antisentido o un aptámero). Una molécula de ácido nucleico aislada puede incluir un gen o una parte de un gen (por ejemplo, la región reguladora o promotor), por ejemplo, para producir una construcción indicadora o una proteína recombinante. Una molécula de ácido nucleico aislada que incluye un gen no es un fragmento de un cromosoma que incluye dicho gen, sino que más bien incluye la región codificante y las regiones reguladoras asociadas con el gen, pero no genes adicionales encontrados de manera natural en el mismo cromosoma. Una molécula de ácido nucleico aislada también puede incluir una secuencia de ácido nucleico específica flanqueada (es decir, en el extremo 5' y/o extremo 3' de la secuencia) por ácidos nucleicos adicionales que normalmente no flanquean la secuencia de ácido nucleico especificada en la naturaleza (es decir, secuencias heterólogas). La molécula de ácido nucleico aislada puede incluir ADN, ARN (por ejemplo, ARNm), o derivados de cualquiera de ADN o ARN (por ejemplo ADNc). Aunque la frase "molécula de ácido nucleico" se refiere principalmente a la molécula física de ácido nucleico y la frase "secuencia de ácido nucleico" se refiere principalmente a la secuencia de nucleótidos en la molécula de ácido nucleico, las dos frases pueden usarse indistintamente, especialmente con respecto a una molécula de ácido nucleico, o a una secuencia de ácido nucleico, que puede codificar una proteína. Preferentemente, una molécula de ácido nucleico aislada de la presente invención

se produce usando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación) o síntesis química.

- 5 El tamaño mínimo de una molécula de ácido nucleico o polinucleótido de la presente invención es un tamaño suficiente para codificar una proteína que tenga una actividad biológica deseada, suficiente para formar una sonda o un cebador oligonucleotídico que pueda formar un híbrido estable con la secuencia complementaria de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína natural (por ejemplo, en condiciones rigurosas moderadas, altas o muy altas), o de otra manera, usarse como una diana o un agente en un ensayo o en cualquier método terapéutico comentado en el presente documento. Si el polinucleótido es una sonda oligonucleotídica o un cebador oligonucleotídico, el tamaño del polinucleótido puede depender de la composición del ácido nucleico y del porcentaje de homología o de identidad entre la molécula de ácido nucleico y una secuencia complementaria, así como de las condiciones de hibridación propiamente dichas (por ejemplo, temperatura, concentración salina y concentración de formamida). El tamaño mínimo de un polinucleótido que se usa como una sonda oligonucleotídica o cebador oligonucleotídico tiene una longitud de al menos aproximadamente 5 nucleótidos, y preferentemente varía de 10 aproximadamente 5 a aproximadamente 50 o de aproximadamente 500 nucleótidos o más (1000, 2000, etc.), incluyendo cualquier longitud entre medias, en incrementos de números enteros (es decir, 5, 6, 7, 8, 9, 10,...33, 15 34,...256, 257,...500...1000...) y más preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 nucleótidos, y más preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud. En un aspecto, el cebador oligonucleotídico o la sonda oligonucleotídica tiene normalmente una longitud de al menos 20 aproximadamente 12 a aproximadamente 15 nucleótidos si las moléculas de ácido nucleico son ricas en GC y una longitud de al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 18 bases si son ricas en AT. No existe límite, que no sea un límite práctico, sobre el tamaño máximo de una molécula de ácido nucleico de la presente invención, ya que la molécula de ácido nucleico puede incluir una parte de una secuencia que codifica una proteína o una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de longitud completa.
- 25 De acuerdo con la presente invención, una sonda oligonucleotídica (o simplemente, sonda), es una molécula de ácido nucleico que más normalmente varía en tamaño de aproximadamente 8 nucleótidos a varios cientos de nucleótidos de longitud. Dicha molécula se usa normalmente para identificar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra hibridándose con dicha secuencia de ácido nucleico diana en condiciones de hibridación rigurosas.
- 30 Como se usa en el presente documento, las condiciones de hibridación rigurosas se refieren a condiciones de hibridación convencionales bajo las cuales las moléculas de ácido nucleico se usan para identificar moléculas de ácido nucleico similares. Dichas condiciones estándar se desvelan, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989. Sambrook *et al.*, ya citado, que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad (véanse específicamente, las páginas 9.31-9.62). Además, 35 se desvelan fórmulas para calcular las condiciones de hibridación y lavado apropiadas para realizar la hibridación permitiendo varios grados de emparejamiento erróneo de nucleótidos, por ejemplo, en Meinkoth *et al.*, 1984, Anal. Biochem. 138, 267-284; Meinkoth *et al.*, ya citado, que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad.
- 40 Más particularmente, las condiciones de hibridación y lavado de rigurosidad moderada, a las que se hace referencia en el presente documento, se refieren a condiciones que permiten el aislamiento de moléculas de ácido nucleico que tienen una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 70 % con la molécula de ácido nucleico que se usa para explorar en la reacción de hibridación (es decir, condiciones que permiten aproximadamente un 30 % o menor de emparejamiento erróneo de nucleótidos). Las condiciones de hibridación y 45 lavado de alta rigurosidad, a las que se hace referencia en el presente documento, se refieren a condiciones que permiten el aislamiento de moléculas de ácido nucleico que tienen una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 80 % con la molécula de ácido nucleico que se usa para explorar en la reacción de hibridación (es decir, condiciones que permiten aproximadamente un 20 % o menor de emparejamiento erróneo de nucleótidos). Las condiciones de hibridación y lavado de alta rigurosidad, a las que se hace referencia en el presente documento, se refieren a condiciones que permiten el aislamiento de moléculas de ácido nucleico que tienen una 50 identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 90 % con la secuencia de ácido nucleico que se usa para explorar en la reacción de hibridación (es decir, condiciones que permiten aproximadamente un 10 % o menor de emparejamiento erróneo de nucleótidos). Como se ha comentado anteriormente, un experto en la técnica puede usar las fórmulas indicadas en Meinkoth *et al.*, ya citado, para calcular las condiciones de hibridación y de lavado apropiadas para conseguir estos niveles particulares de emparejamiento erróneo de nucleótidos. Dichas 55 condiciones variarán, dependiendo de si se van a formar híbridos de ADN:ARN o ADN:ADN. Las temperaturas de fusión calculadas para los híbridos de ADN:ADN son 10 °C más bajas para los híbridos de ADN:ARN. En realizaciones particulares, las condiciones de hibridación rigurosas para los híbridos de ADN:ADN incluyen la hibridación a una fuerza iónica de 6X SSC (Na^+ 0,9 M) a una temperatura de entre aproximadamente 20 °C y 60 aproximadamente 35 °C (rigurosidad más baja), más preferentemente, entre aproximadamente 28 °C y aproximadamente 40 °C (más rigurosidad), e incluso más preferentemente, entre aproximadamente 35 °C y aproximadamente 45 °C (incluso más rigurosas), con condiciones de lavado apropiadas. En realizaciones particulares, las condiciones de hibridación rigurosas para híbridos de ADN:ARN incluyen hibridación a una fuerza iónica de 6X SSC (Na^+ 0,9 M) a una temperatura de entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 45 °C, más preferentemente, entre aproximadamente 38 °C y aproximadamente 50 °C, e incluso más preferentemente, entre 65 aproximadamente 45 °C y aproximadamente 55 °C, con condiciones de lavado similarmente rigurosas. Estos valores

- se basan en cálculos de una temperatura de fusión para moléculas más grandes de aproximadamente 100 nucleótidos, formamida al 0 % y un contenido de G + C de aproximadamente 40 %. Como alternativa, la T_f puede calcularse empíricamente como se indica en Sambrook *et al.*, indicado anteriormente, páginas 9.31 a 9.62. En general, las condiciones de lavado deben ser tan rigurosas como sea posible, y deben ser apropiadas para las 5 condiciones de hibridación seleccionadas. Por ejemplo, las condiciones de hibridación pueden incluir una combinación de condiciones salinas y de temperatura que sean de aproximadamente 20-25 °C por debajo de la T_f calculada de un híbrido particular, y las condiciones de lavado normalmente incluyen una combinación de condiciones salinas y de temperatura que son de aproximadamente 12-20 °C por debajo de la T_f calculada del híbrido particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación adecuadas para su uso con híbridos de ADN:ADN 10 incluye una hibridación de 2-24 horas en 6X SSC (formamida al 50 %) a aproximadamente 42 °C, seguido de etapas de lavado que incluyen uno o más lavados a temperatura ambiente en aproximadamente 2X SSC, seguido de lavados adicionales a temperaturas más elevadas y a una fuerza iónica más baja (por ejemplo, al menos un lavado a aproximadamente 37 °C en aproximadamente 0,1X-0,5X SSC, seguido de al menos un lavado a aproximadamente 68 °C en aproximadamente 0,1X-0,5X SSC). 15
- Los cebadores de PCR también son secuencias de ácido nucleico, aunque los cebadores de PCR son normalmente oligonucleótidos de longitud bastante corta que se usan en reacciones en cadena de la polimerasa. Los expertos en la técnica pueden desarrollar y producir fácilmente cebadores y sondas de hibridación de PCR usando información de secuencias de la secuencia diana. (Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente o "Molecular Biotechnology," Segunda Edición, de Glick y Pasternak, ASM Press, Washington D.C., 1998, págs. 555-590). 20
- El conocimiento de las secuencias de ácido nucleico de determinadas moléculas de ácido nucleico de la presente invención permite a un experto en la materia, por ejemplo (a) realizar copias de esas moléculas de ácido nucleico y/o 25 (b) obtener moléculas de ácido nucleico incluyendo al menos una parte de dichas moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico incluyendo genes de longitud completa, regiones codificantes de longitud completa, secuencias de control reguladoras, regiones codificantes truncadas). Dichas moléculas de ácido nucleico pueden obtenerse de diversas maneras incluyendo técnicas tradicionales de clonación usando sondas oligonucleotídicas para explorar bibliotecas apropiadas o ADN y amplificación por PCR de bibliotecas apropiadas o ADN usando cebadores oligonucleotídicos. Las bibliotecas preferidas para explorar o a partir de las cuales se 30 amplifica la molécula de ácido nucleico, incluyen bibliotecas de ADN genómico de mamíferos. Las técnicas para clonar y amplificar genes se desvelan, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, citado anteriormente.
- Como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico antisentido se define como una molécula de ácido nucleico aislada que reduce la expresión de una proteína hibridándose, en condiciones de alta rigurosidad, 35 con un gen que codifica la proteína. Dicha molécula de ácido nucleico es suficientemente similar al gen que codifica la proteína de manera que la molécula puede hibridarse en condiciones de alta rigurosidad con la cadena codificante o complementaria del gen o ARN que codifica la proteína natural.
- La interferencia del ARN (iARN) es un proceso mediante el cual un ARN bicatenario, y en sistemas de mamífero, un ARN de interferencia pequeño (ARNip), se usa para inhibir o silenciar la expresión de genes complementarios. En la célula diana, el ARNip no está enrollado y se asocia con un complejo silenciador inducido por ARN (CSIR), que 40 después se conduce a las secuencias de ARNm que son complementarias al ARNip, mediante lo cual el CSIR escinde el ARNm.
- Una ribozima es un segmento de ARN que actúa uniéndose al resto de ARN diana y lo inactiva escindiendo la estructura fosfodiéster en un sitio de corte específico. Una ribozima puede servir como un vehículo de suministro diana para una molécula de ácido nucleico, o como alternativa, la ribozima puede dirigirse y unirse al ARN que codifica el biomarcador, por ejemplo, y por lo tanto inhibir eficazmente la traducción del biomarcador. 45
- Los aptámeros son cadenas cortas de ácidos nucleicos sintéticos (normalmente ARN pero también ADN) seleccionadas de bibliotecas combinatorias de ácidos nucleicos aleatorizadas en virtud de su capacidad para unirse a una molécula diana específica predeterminada con alta afinidad y especificidad. Los aptámeros asumen una estructura tridimensional definida y pueden diferenciar entre compuestos con diferencias muy pequeñas en estructura. 50
- Una molécula de ácido nucleico recombinante es una molécula que puede incluir al menos una de cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína ZnT8 u otra proteína descrita en el presente documento. En una realización, una molécula de ácido nucleico recombinante está unida operativamente a al menos una secuencia de control de expresión que puede regular eficazmente la expresión de la molécula (o moléculas) de ácido nucleico 55 en una célula hospedadora. Preferentemente, una molécula de ácido nucleico recombinante se produce usando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, amplificación con reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación). Una molécula de ácido nucleico recombinante incluye un vector recombinante, que es cualquier secuencia de ácido nucleico, normalmente una secuencia heteróloga, que está unida operativamente a la molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína (por ejemplo, ZnT8), que puede permitir la producción recombinante de la proteína, o que puede suministrar la molécula de ácido nucleico al interior de la célula hospedadora *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, de acuerdo con la presente invención. Dicho vector puede contener 60 65

- secuencias de ácido nucleico que no se encuentran de manera natural adyacentes a las moléculas de ácido nucleico aisladas a insertar en el vector. El vector puede ser de ARN o ADN, procariota o eucariota, y preferentemente en la presente invención, es un virus o un plásmido. Los vectores recombinantes pueden usarse en la clonación, secuenciación, y/o de lo contrario en la manipulación de moléculas de ácido nucleico. Los vectores recombinantes se usan preferentemente en la expresión de moléculas de ácido nucleico, y también pueden denominarse vectores de expresión. Los vectores recombinantes preferidos pueden expresarse en una célula hospedadora transfectada, y particularmente, en una célula hospedadora de mamífero transfectada *in vivo*.
- En una molécula recombinante de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico están unidas operativamente a vectores de expresión que contienen secuencias reguladoras tales como secuencias de control de la transcripción, secuencias de control de la traducción, orígenes de replicación y otras secuencias reguladoras que sean compatibles con la célula hospedadora y que controlen la expresión de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención. La frase "unida operativamente" se refiere a la unión de una molécula de ácido nucleico con una secuencia de control de la expresión de tal manera que la molécula se exprese cuando se transfete (es decir, se transforme, transduzca o transfete) en una célula hospedadora.
- Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan el inicio, la elongación y la terminación de la transcripción. Particularmente importantes son las secuencias de control de la transcripción que controlan el inicio de la transcripción, tales como secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras. Las secuencias de control de la transcripción adecuadas incluyen cualquier secuencia de control de la transcripción que pueda actuar en una célula hospedadora de acuerdo con la presente invención. Los expertos en la técnica conocen diversas secuencias de control de la transcripción adecuadas. Las secuencias de control de la transcripción particularmente preferidas incluyen promotores inducibles, promotores específicos de célula, promotores específicos de tejido (por ejemplo, promotores de insulina) y potenciadores. Las secuencias de control de la transcripción de la presente invención también pueden incluir secuencias de control de la transcripción de origen natural asociadas con la proteína a expresar antes del aislamiento. En una realización, una secuencia de control de la transcripción incluye un promotor inducible.
- Un tipo de vector recombinante útil en una molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención es un vector viral recombinante. Dicho vector incluye una secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica una proteína ZnT8 de la presente invención que está empaquetada en una cubierta viral que puede expresarse en una célula hospedadora en un animal o *ex vivo* después de la administración. Pueden usarse diversos vectores virales recombinantes, incluyendo, pero sin limitación, los basados en alfavirus, poxvirus, adenovirus, herpesvirus, lentivirus, virus adenoasociados y retrovirus. Los vectores virales particularmente preferidos son aquellos basados en adenovirus y en virus adenoasociados. Los vectores virales idóneos para la administración de genes son bien conocidos en la técnica y pueden seleccionarse por el experto en la materia para su uso en la presente invención. Un análisis detallado de vectores virales corrientes se proporciona en "Molecular Biotechnology," Segunda Edición, de Glick y Pasternak, ASM Press, Washington D.C., 1998, págs. 555-590, que se incorpora en su totalidad por referencia en el presente documento.
- Las células hospedadoras adecuadas para transfectar con una molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier célula microbiana, de insecto, o de animal que pueda transfectarse. Las células hospedadoras pueden ser células no transfectadas o células que ya se han transfectado con al menos una molécula de ácido nucleico.
- De acuerdo con la presente invención, el término "transfección" se usa para referirse a cualquier método mediante el cual una molécula de ácido nucleico exógena (es decir, una molécula de ácido nucleico recombinante) puede insertarse en la célula. El término "transformación" puede usarse indistintamente con el término "transfección" cuando dicho término se usa para hacer referencia a la introducción de moléculas de ácido nucleico en células microbianas, tales como bacterias y levaduras. En sistemas microbianos, el término "transformación" se usa para describir un cambio hereditario debido a la adquisición de ácidos nucleicos exógenos por el microorganismo y es esencialmente sinónimo al término "transfección". Sin embargo, en células animales, la transformación ha adquirido un segundo significado que puede referirse a cambios en las propiedades de crecimiento de las células en cultivo después de hacerse cancerosas, por ejemplo. Por lo tanto, para evitar confusiones, el término "transfección" se usa preferentemente con respecto a la introducción de ácidos nucleicos exógenos en células animales y el término "transfección" se usará en el presente documento para incluir en general tanto la transfección de células animales como la transformación de células microbianas, hasta el nivel de que los términos se aplican a la introducción de ácidos nucleicos exógenos en una célula. Por lo tanto, las técnicas de transfección incluyen, pero sin limitación, transformación, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción, infección y fusión de protoplastos.
- Como se usa en el presente documento, en relación a una proteína o polipéptido en la presente invención, incluyendo una proteína ZnT8, es una proteína que se ha eliminado de su medio natural (es decir, que se ha sometido a manipulación humana), e incluye proteínas de longitud completa, proteínas de fusión o quiméricas, o cualquier fragmento u homólogo de dicha proteína. Dicha proteína puede incluir, pero sin limitación, proteínas purificadas, proteínas parcialmente purificadas, proteínas producidas de manera recombinante, proteínas producidas de manera sintética, proteínas unidas a membrana, proteínas formando complejos con lípidos, proteínas solubles y

proteínas aisladas asociadas con otras proteínas. Como tal, el término "aislada" no refleja el grado al cual la proteína se ha purificado. Preferentemente, una proteína aislada de la presente invención se produce de manera recombinante. Además, y de nuevo como ejemplo, una "proteína ZnT8 humana" o una proteína "derivada de" una proteína ZnT8 humana se refiere a una proteína ZnT8 (generalmente incluyendo un homólogo de una proteína ZnT8 de origen natural) de un ser humano (*Homo sapiens*) o a una proteína ZnT8 que, de otra manera, se ha producido a partir del conocimiento de la estructura (por ejemplo, secuencia) y quizás la función de una proteína ZnT8 de origen natural de *Homo sapiens*. En otras palabras, una proteína ZnT8 humana incluye cualquier proteína ZnT8 que tenga sustancialmente una estructura y función similar a la de una proteína ZnT8 de origen natural de *Homo sapiens* o que sea un homólogo biológicamente activo (es decir, tenga actividad biológica) de una proteína ZnT8 de *Homo sapiens* de origen natural como se describe con detalle en el presente documento. Como tal, una proteína ZnT8 humana puede incluir proteínas purificadas, parcialmente purificadas, recombinantes, mutadas/modificadas y sintéticas. De acuerdo con la presente invención, los términos "modificación" y "mutación" pueden usarse indistintamente, particularmente con respecto a las modificaciones/mutaciones de la secuencia de aminoácidos de la proteína (o secuencias de ácido nucleico) descritas en el presente documento. Una proteína aislada útil como un antagonista o agonista de acuerdo con la presente invención puede aislarse de su fuente natural, producirse de manera recombinante o de manera sintética.

Las proteínas de fusión y las proteínas químéricas también se incluyen en la invención. Una proteína de fusión es una proteína producida por la unión (normalmente de manera recombinante, aunque en la invención también se incluyen uniones químicas y otros tipos de unión) de una proteína o péptido de la invención (por ejemplo, ZnT8 o una variante o fragmento de la misma) con un compañero de fusión (segmento de fusión). Los compañeros de fusión adecuados para su uso con la presente invención incluyen, pero sin limitación, compañeros de fusión que pueden: potenciar una estabilidad de la proteína; potenciar o permitir la secreción de una proteína a partir de la célula hospedadora; proporcionar otra actividad biológica; y/o ayudar a la purificación de una proteína de una célula hospedadora (por ejemplo, por cromatografía de afinidad). Un compañero de fusión adecuado puede ser una proteína o un dominio o un fragmento de la misma de cualquier tamaño que tenga la función deseada (por ejemplo, otorgue estabilidad, solubilidad, acción o actividad aumentadas; proporcione otra actividad; y/o simplifique la purificación de una proteína). Los compañeros de fusión pueden unirse a un extremo amino y/o carboxilo de la proteína de interés (por ejemplo, ZnT8), y pueden ser susceptibles a escisión para permitir la recuperación directa-inversa de la proteína exógena expresada. Una proteína químérica es similar a una proteína de fusión, y los términos pueden usarse indistintamente, excepto que en el caso de la proteína químérica, el compañero de fusión es más normalmente una segunda proteína de interés (o un fragmento de la misma), tal como una segunda proteína con una actividad biológica deseada. Por consiguiente, una proteína químérica puede tener la actividad de cada uno/ambos componentes de la proteína/péptido, o una nueva actividad resultante de la combinación de dominios de proteína.

En una realización preferida, las proteínas (incluyendo péptidos y homólogos) se producen usando sistemas de traducción *in vitro*, tales como sistemas basados en lisados reticulocíticos, germen de trigo, levaduras y bacterias. Preferentemente, los sistemas procesan la proteína correctamente de manera posttraduccional, por ejemplo, por proteólisis y/o glucosilación. Los productos de sistemas de traducción *in vitro* se usan más normalmente en los métodos de la invención, aunque la invención no está limitada a dichos productos.

Como se usa en el presente documento, el término "homólogo" o "variante" se usa para referirse a una proteína o péptido que se diferencia de una proteína o péptido de origen natural (es decir, la proteína "prototipo" o "de tipo silvestre") por modificaciones minoritarias en la proteína o péptido de origen natural, pero que conserva la estructura básica de la proteína y de la cadena lateral de la forma de origen natural. Dichos cambios incluyen, pero sin limitación: cambios en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o algunos aminoácidos más en la cadena lateral; cambios en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o algunos aminoácidos, incluyendo delecciones (por ejemplo, una versión truncada de la proteína o péptido) inserciones y/o sustituciones; cambios en la estereoquímica de uno o algunos átomos; y/o derivatizaciones minoritarias, incluyendo, pero sin limitación: metilación, glucosilación, fosforilación, acetilación, miristoilación, prenilación, palmitación, amidación y/o adición de glucosilfosfatidil inositol. Un homólogo puede tener propiedades potenciadas, disminuidas o sustancialmente similares en comparación con la proteína o péptido de origen natural. Un homólogo puede incluir un agonista de una proteína o un antagonista de una proteína.

Los homólogos pueden ser el resultado de una variación alélica natural o polimorfismo genético, o cualquier mutación natural. Una variante alélica o polimorfismo genético de origen natural de un ácido nucleico que codifica una proteína es un gen que se produce esencialmente en el mismo locus (o loci) en el genoma que el gen que codifica dicha proteína, pero que, debido a variaciones naturales, tiene una secuencia similar aunque no idéntica. Las variantes alélicas codifican normalmente proteínas que tienen actividad similar a la de la proteína codificada por el gen con el cual se está comparando. Un polimorfismo mononucleotídico (SNP) es una variación de secuencia de ADN que se produce cuando en el genoma un solo nucleótido se diferencia entre miembros de una especie, o entre cromosomas emparejados en un individuo. Debido a variaciones entre poblaciones humanas, un alelo SNP que es común en un grupo geográfico o étnico puede ser mucho menos frecuente en otro. Además, variaciones en las secuencias de ADN de seres humanos pueden afectar a cómo los humanos desarrollan enfermedades y responden a patógenos, productos químicos, fármacos, vacunas y otros agentes, y que se ha ilustrado en el presente documento mediante la respuesta de autoanticuerpo a polimorfismos que se producen en el gen de ZnT8.

- Una clase de variantes alélicas puede codificar la misma proteína pero tener diferentes secuencias de ácido nucleico debido a la degeneración del código genético. Las variantes alélicas también pueden comprender alteraciones en las regiones 5' o 3' no traducidas del gen (por ejemplo, en regiones de control reguladoras). Los expertos en la materia conocen bien variantes alélicas.
- Los homólogos pueden producirse usando técnicas conocidas en la materia para la producción de proteínas incluyendo, pero sin limitación, modificaciones directas en la proteína de origen natural, aislada, síntesis directa de proteínas, o modificaciones en la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína usando, por ejemplo, técnicas de ADN clásicas o recombinantes para efectuar la mutagénesis al azar o dirigida.
- De acuerdo con la presente invención, una proteína aislada, incluyendo un homólogo o fragmento biológicamente activo de la misma, tiene al menos una característica de actividad biológica de actividad de la proteína de referencia de tipo silvestre, o de origen natural (que puede variar dependiendo de si el homólogo o fragmento que se describe es un agonista o antagonista de la proteína, o de si es un mimético agonista o antagonista de la proteína). En general, la actividad biológica o acción biológica de una proteína se refiere a cualquier función o funciones mostradas o realizadas por la proteína que se atribuyen a la forma de origen natural de la proteína medida u observada *in vivo* (es decir, en el medio fisiológico natural de la proteína) o *in vitro* (es decir, en condiciones de laboratorio).
- La actividad biológica de una proteína ZnT8 de la invención incluye el transporte de cinc fuera de las células o el secuestro de cinc en compartimentos intracelulares. Más particularmente, una actividad biológica de ZnT8 de acuerdo con la invención incluye la translocación del cinc citoplasmático en vesículas intracelulares de las células β de los islotes. Otras actividades biológicas de ZnT8 útiles en la presente invención incluyen la inducción de una respuesta inmunitaria contra ZnT8, incluyendo una respuesta inmunitaria tanto celular como humorral, así como la capacidad de ser reconocida por un agente de unión en un ensayo (por ejemplo, formando una estructura primaria o terciaria o epítopo conformacional que puede reconocer un agente de unión a ZnT8 específico).
- Las modificaciones, actividades o interacciones que den como resultado una disminución en la expresión de la proteína o una disminución en la actividad de la proteína, pueden mencionarse como inactivación (completa o parcial), regulación negativa, acción reducida, o acción o actividad disminuida de una proteína. De manera similar, las modificaciones, actividades o interacciones que den como resultado un aumento en la expresión de la proteína o un aumento en la actividad de la proteína, pueden mencionarse como amplificación, sobreproducción, activación, potenciación, regulación positiva o acción aumentada de una proteína. La actividad biológica de una proteína de acuerdo con la invención, y particularmente de una proteína ZnT8, puede medirse o evaluarse usando cualquier ensayo de actividad biológica de la proteína conocido en la técnica. Dichos ensayos pueden incluir, pero sin limitación, ensayos de unión (incluyendo varios ensayos inmunológicos), ensayos para determinar la internalización o localización de la proteína y/o proteínas asociadas, ensayos de transporte de cinc (véase, por ejemplo, el ensayo de cinquin descrito en Chimienti *et al.*, 2004, *Diabetes*, citado anteriormente) y/o ensayos para determinar los sucesos celulares aguas abajo que resultan de la actividad de la proteína.
- Como se usa en el presente documento, a menos que se especifique otra cosa, la referencia o a un porcentaje (%) de identidad se refiere a una evaluación de homología que se realiza usando: (1) una búsqueda de homología BLAST básica BLAST 2.0 usando blastp para búsquedas de aminoácidos y blastn para búsquedas de ácidos nucleicos con parámetros patrón predeterminados, donde la secuencia problema se filtra para regiones de complejidad baja por defecto (descrito en Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. (1997) "Gapped BLAST y PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad); (2) un alineamiento BLAST 2 (usando los parámetros descritos más adelante); (3) y/o PSI-BLAST con los parámetros patrón predeterminados (BLAST Iterado Específico de Posición). Debe observarse que, debido a algunas diferencias en los parámetros patrón entre el BLAST Básico BLAST 2.0 y el BLAST 2, podrían reconocerse dos secuencias específicas como que tienen homología significativa usando el programa BLAST 2, mientras que una búsqueda realizada en BLAST Básico BLAST 2.0 usando una de las secuencias como secuencia problema no puede identificar la segunda secuencia en las coincidencias superiores. Además, PSI-BLAST proporciona una versión automatizada, fácil de usar de una búsqueda "perfil", que es una forma sensible de buscar homólogos de secuencias. El programa realiza primero una búsqueda de huecos en las bases de datos BLAST. El programa PSI-BLAST usa la información de cualquier alineamiento significativo que regresa a la construcción de una matriz de puntuación específica de posición, que reemplaza la secuencia problema por la siguiente ronda de búsqueda en la base de datos. Por lo tanto, debe entenderse que el porcentaje de identidad puede determinarse usando uno cualquiera de estos programas.
- Dos secuencias específicas pueden alinearse entre sí usando la secuencia BLAST 2 como se describe en Tatusova y Madden, (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174: 247-250, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad. El alineamiento de secuencia BLAST 2 se realiza en blastp o blastn usando el algoritmo BLAST 2.0 para realizar una búsqueda BLAST de huecos (BLAST 2.0) entre las dos secuencias lo que permite la introducción de huecos (delecciones e inserciones)

en el alineamiento resultante. Para fines de claridad en el presente documento, un alineamiento de secuencias BLAST 2 se realiza usando los siguientes parámetros patrón predeterminados.

Para blastn, usando una matriz 0 BLOSUM62:

5 Recompensa para coincidencia = 1
 Penalización para emparejamiento erróneo = -2
 Penalizaciones por apertura de huecos (5) y extensión de huecos (2)
 Caída de alineación de hueco x (50) esperado (10) tamaño de palabra (11) filtro (activado)

10 Para blastp, usado una matriz 0 BLOSUM62:

15 Penalizaciones por apertura de huecos (11) y extensión de huecos (1)
 Caída de alineación de hueco x (50) esperado (10) tamaño de palabra (3) filtro (activado).

15 Como se usa en el presente documento, una referencia a un “agonista” de una proteína determinada se refiere a cualquier compuesto que se caracteriza por la capacidad para agonizar (por ejemplo, estimular, inducir, aumentar, potenciar o imitar) la actividad biológica de la proteína de origen natural, e incluye cualquier homólogo, proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo), agente que interaccione con una proteína o receptor unido por la proteína, o cualquier producto adecuado de diseño fármaco/compuesto/péptido o selección que se caracterice por su capacidad para agonizar (por ejemplo, estimular, inducir, aumentar, potenciar) la actividad biológica de la proteína de origen natural de una manera similar a la del agonista natural, que es la proteína de referencia.

20 De manera similar, una referencia a un “antagonista” se refiere a cualquier compuesto que inhibe (por ejemplo, antagoniza, reduce, disminuye, bloquea, invierte o altera) el efecto de un agonista determinado de una proteína (incluyendo la propia proteína) como se describe anteriormente. Más particularmente, un antagonista puede actuar de una manera relativa a la actividad de la proteína, de tal manera que la actividad biológica del agonista natural o proteína de referencia disminuye de una manera que es antagonista (por ejemplo, en contra, inversa, contraria a) la acción natural de la proteína. Dichos antagonistas pueden incluir, pero sin limitación, una proteína, péptido, o ácido nucleico (incluyendo ribozimas, iARN, aptámeros y antisentido), anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, o un producto de diseño fármaco/compuesto/péptido o selección que proporcione el efecto antagonista.

25 Los homólogos de una proteína determinada, tal como ZnT8, incluyendo agonistas y antagonistas (análogos) peptídicos y no peptídicos, pueden ser productos de diseño o selección de fármacos y pueden producirse usando diversos métodos conocidos en la técnica. Dichos homólogos pueden denominarse miméticos. Diversos métodos de diseño de fármacos, útiles para diseñar o seleccionar miméticos u otros compuestos terapéuticos útiles en la presente invención se desvelan en Maulik *et al.*, 1997, Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies, Wiley-Liss, Inc., que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

30 40 Como se usa en el presente documento, un mimético se refiere a cualquier compuesto peptídico o no peptídico que es capaz de imitar la acción biológica de un péptido de origen natural, a menudo porque el mimético tiene una estructura básica que imita la estructura básica del péptido de origen natural y/o tiene las propiedades biológicas destacadas del péptido de origen natural. Los miméticos pueden incluir, pero sin limitación: péptidos que tienen modificaciones sustanciales del prototipo tal como ninguna similitud en la cadena lateral con el péptido de origen natural (dichas modificaciones, por ejemplo, pueden disminuir su susceptibilidad a la degradación); anticuerpos anti-idiotípicos y/o catalíticos, o fragmentos de los mismos; partes no proteicas de una proteína aislada (por ejemplo, estructuras carbohidrato); o moléculas orgánicas sintéticas o naturales, incluyendo ácidos nucleicos y fármacos identificados, por ejemplo, a través de química combinatoria. Dichos miméticos pueden diseñarse, seleccionarse y/o de otra manera identificarse usando diversos métodos conocidos en la técnica.

45 50 Un mimético puede obtenerse, por ejemplo, a partir de estrategias de diversidad molecular (una combinación de estrategias relacionadas que permiten la construcción rápida de grandes bibliotecas de moléculas químicamente diversas), bibliotecas de compuestos naturales o sintéticos, en particular de bibliotecas químicas o combinatorias (es decir, bibliotecas de compuestos que difieren en secuencia o tamaño pero que tienen bloques de construcción similares) o por diseño racional, dirigido o al azar de fármacos. Véase, por ejemplo, Maulik *et al.*, citado anteriormente.

55 60 En una estrategia de diversidad molecular, se sintetizan grandes bibliotecas de compuestos, por ejemplo, de péptidos, oligonucleótidos, hidratos de carbono y/o moléculas orgánicas sintéticas, usando estrategias biológicas, enzimáticas y/o químicas. Los parámetros críticos en el desarrollo de una estrategia de diversidad molecular incluyen diversidad subunitaria, tamaño molecular y diversidad de bibliotecas. El objetivo general de la exploración de dichas bibliotecas es utilizar aplicación secuencial de selección combinatoria para obtener ligandos de alta afinidad para una diana deseada, y después optimizar las moléculas líder mediante estrategias de diseño bien al azar o dirigidas. Los métodos de diversidad molecular se describen con detalle en Maulik, *et al.*, citado anteriormente.

En un procedimiento de diseño de fármacos racional, la estructura tridimensional de un compuesto regulador puede analizarse, por ejemplo, por resonancia magnética nuclear (RMN) o cristalografía de rayos X. Esta estructura tridimensional puede usarse después para predecir estructuras de posibles compuestos, tales como posibles agentes reguladores, por ejemplo, por modelado informático. La estructura prevista del compuesto puede usarse para optimizar compuestos líder derivados, por ejemplo, por métodos de diversidad molecular. Además, la estructura prevista del compuesto puede producirse, por ejemplo, por síntesis química, tecnología de ADN recombinante o aislando un mimótopo de una fuente natural (por ejemplo, plantas, animales, bacterias y hongos).

Maulik *et al.* también desvelan, por ejemplo, métodos de diseño dirigido, en los que el usuario dirige el proceso de crear nuevas moléculas a partir de una biblioteca de fragmentos de fragmentos apropiadamente seleccionados; diseño al azar en el que usuario usa un algoritmo genético u otro para mutar al azar fragmentos y sus combinaciones, al mismo tiempo que aplica simultáneamente un criterio de selección para evaluar la idoneidad de ligandos candidatos; y una estrategia basada en cuadrícula en la que el usuario calcula la energía de interacción entre estructuras receptoras tridimensionales y sondas de fragmentos pequeños, seguido de unión conjunta de sitios de sondas favorables.

Anticuerpos y compañeros de unión a antígeno de la invención

En la presente invención también se incluyen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen selectivamente a ZnT8, así como el uso de dichos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Los anticuerpos que se unen selectivamente a una proteína pueden producirse usando la información estructural disponible para la proteína (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de al menos una parte de la proteína). Como se usa en el presente documento, la expresión "se une selectivamente a" se refiere a la unión específica de una proteína con otra (por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento del mismo, o compañero de unión a un antígeno), en el que el nivel de unión, medido por cualquier ensayo convencional (por ejemplo, un inmunoensayo), es estadísticamente significativo mayor que el control de fondo para el ensayo. Por ejemplo, cuando se realiza un inmunoensayo, los controles incluyen normalmente un pocillo/tubo de reacción que contienen el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en solitario (es decir sin antígeno), en el que la cantidad de reactividad (por ejemplo, unión no específica al pocillo) por el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en ausencia del antígeno se considera que es el fondo. La unión puede medirse usando diversos métodos convencionales en la técnica, incluyendo, pero sin limitación: transferencia de Western, inmunotransferencia, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, resonancia de plasmón superficial, quimioluminiscencia, polarización fluorescente, fosforescencia, análisis inmunohistoquímico, espectrometría de masas con desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF), microcitometría, micromatríz, microscopía, separación de células activadas por fluorescencia (FACS) y citometría de flujo.

De acuerdo con la presente invención, un "epítopo" de una proteína o péptido determinado u otra molécula se define generalmente, con respecto a anticuerpos, como una parte de o un sitio sobre una molécula más grande a la cual se unirá un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, y contra el cual se producirá un anticuerpo. El término epítopo puede usarse indistintamente con el término "determinante antigenético", "sitio de unión a anticuerpo" o "superficie de unión conservada" de una proteína o antígeno determinados. Más específicamente, un epítopo puede definirse tanto por los restos de aminoácidos implicados en la unión al anticuerpo como también por su conformación en el espacio tridimensional (por ejemplo, un epítopo conformacional o la superficie de unión conservada). Un epítopo puede incluirse en péptidos tan pequeños como aproximadamente 4-6 restos de aminoácidos, o puede incluirse en segmentos más largos de una proteína, y no requiere estar comprendido por restos de aminoácidos contiguos cuando se refiere a una estructura tridimensional de un epítopo, particularmente con respecto a un epítopo de unión a anticuerpo. Los epítopos de unión a anticuerpo son frecuentemente epítopos conformacionales en lugar de epítopos secuenciales (es decir, epítopos lineales), o en otras palabras, un epítopo definido por restos de aminoácidos dispuestos en tres dimensiones sobre la superficie de una proteína o polipéptido a la cual/al cual se une un anticuerpo. Como se ha mencionado anteriormente, el epítopo conformacional no comprende ninguna secuencia contigua de restos de aminoácidos, sino más bien, los restos están quizás muy separados en la secuencia primaria de la proteína, y se ponen en contacto entre sí para formar una superficie de unión mediante los plegamientos de la proteína en su conformación nativa en tres dimensiones. Por consiguiente, la presente invención incluye cualquiera de las proteínas o péptidos que comprendan o consistan en cualquiera de los epítopos de ZnT8, así como anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno u otros compañeros de unión (péptidos de unión) que se unan a cualquier epítopo de una proteína ZnT8.

Un "isoepítopo", de acuerdo con la invención, es un epítopo que existe en formas o isoformas variantes (naturalmente o por diseño sintético), tal como un epítopo contiene una posición (o posiciones) de aminoácido variante polimórfica. En el presente documento se describe un ejemplo de un isoepítopo mediante un epítopo de ZnT8 que contiene la posición 325, en el que un isoepítopo contiene una arginina en la posición 325, y en el que dos variantes distintas se producen de manera natural están en esa posición (Trp325 y Gln325). Estas tres variantes son isoepítopos.

- Un experto en la técnica puede identificar y/o ensamblar epítopos conformacionales y/o epítopos secuenciales usando técnicas conocidas, incluyendo análisis mutacional (por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio); protección de degradación proteolítica (impronta proteica); análisis de mimótopos usando, por ejemplo, péptidos sintéticos y pepscan, BIACORE o ELISA; mapeo de competición de anticuerpos; exploración de bibliotecas peptídicas combinatorias; espectrometría de masas con desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF); o modelado tridimensional (por ejemplo, usando cualquier programa informático adecuado, incluyendo, pero sin limitación, MOLSCRIPT 2.0 (Avatar Software AB, Heleneborgsgatan 21C, SE 11731 Estocolmo, Suecia), el programa de presentación de gráficos O (Jones *et. al.*, Acta Crystallography, vol. A47, p. 110, 1991), el programa de presentación de gráficos GRASP o el programa de presentación de gráficos INSIGHT). Por ejemplo, se 5 puede usar reemplazo molecular u otras técnicas y la estructura tridimensional conocida de una proteína relacionada para modelar la estructura tridimensional de ZnT8 y predecir el epítopo de unión a anticuerpo conformacional con esta estructura. De hecho, para definir el epítopo de unión a anticuerpo puede usarse una o cualquier combinación de dichas técnicas.
- 10 Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden incluir anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos divalentes y monovalentes, anticuerpos bi o multiespecíficos, suero que contenga dichos anticuerpos, anticuerpos que se hayan purificado a diversos grados, y cualquiera de los equivalentes funcionales de anticuerpos completos. Los anticuerpos aislados de la presente invención pueden incluir suero que contenga dichos anticuerpos, o 15 anticuerpos que se han purificado a diversos grados. Como alternativa, equivalentes funcionales de anticuerpos completos, tales como fragmentos de unión a antígeno en los que uno o más dominios de anticuerpos están truncados o ausentes (por ejemplo, fragmentos Fv, Fab, Fab', o F(ab)₂), así como anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos modificados por ingeniería genética, incluyendo anticuerpos monocatenarios o anticuerpos que 20 pueden unirse a más de un epítopo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos), o anticuerpos que pueden unirse a uno o más diferentes antígenos (por ejemplo, anticuerpos bi o multiespecíficos), también pueden emplearse en la 25 invención.
- Los anticuerpos modificados por ingeniería genética incluyen aquellos producidos por técnicas de ADN recombinante convencionales, que implican la manipulación y reexpresión de ADN que codifica las regiones variables y/o constantes del anticuerpo. Ejemplos particulares incluyen, anticuerpos químéricos, en los que los 30 dominios V_H y/o V_L del anticuerpo proceden de una fuente diferente a la del resto del anticuerpo, y anticuerpos con injertos de CDR (y fragmentos de unión a antígeno de los mismos), en los que al menos una secuencia de CDR y opcionalmente al menos un aminoácido de armazón de la región variable procede de una fuente y las partes restantes de las regiones variables y constantes (según sea apropiado) proceden de una fuente diferente. La 35 construcción de anticuerpos químéricos y con injerto de CDR se describen, por ejemplo, en las Solicitudes de Patente Europeas: EP-A 0194276, EP-A 0239400, EP-A 0451216 y EP-A 0460617.
- Generalmente en la producción de un anticuerpo, un animal experimental idóneo, tal como, por ejemplo, pero sin limitación, un conejo, una oveja, un hámster, una cobaya, un ratón, una rata o un pollo, se expone a un antígeno contra el cual se desea un anticuerpo. Normalmente, un animal se inmuniza con una cantidad eficaz de antígeno 40 que se inyecta en el animal. Una cantidad eficaz de antígeno se refiere a una cantidad necesaria para inducir la producción de anticuerpos por el animal. Se deja después que el sistema inmunitario del animal responda durante un periodo de tiempo predeterminado. El proceso de inmunización puede repetirse hasta que se observa que el sistema inmunitario produce los anticuerpos contra el antígeno. Para obtener anticuerpos policlonales específicos para el antígeno, se recoge suero del animal que contiene los anticuerpos deseados (o en el caso de un pollo, el anticuerpo puede recogerse en los huevos). Dicho suero es útil como un reactivo. Los anticuerpos policlonales 45 pueden purificarse además del suero (o huevos) por ejemplo tratando el suero con sulfato de amonio.
- Los anticuerpos monoclonales pueden producirse de acuerdo con la metodología de Kohler y Milstein (Nature 256: 495-497, 1975). Por ejemplo, los linfocitos B se recuperan del bazo (o de cualquier tejido adecuado) de un animal 50 inmunizado y después se fusionan con células de mieloma para obtener una población de células de hibridoma capaces de continuar el crecimiento en un medio de cultivo adecuado. Los hibridomas que producen el anticuerpo deseado se seleccionan ensayando la capacidad del anticuerpo producido por el hibridoma para unirse al antígeno deseado.
- La invención también se extiende a polipéptidos no anticuerpo, algunas veces denominados compañeros de unión a 55 antígeno o péptidos de unión a antígeno, que se han diseñado para unirse selectivamente a la proteína de interés. Los ejemplos del diseño de dichos polipéptidos, que poseen un ligando prescrito específico se proporcionan en Beste *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 1898-1903, 1999), incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad.
- De acuerdo con la presente invención, el uso general del presente documento del término "antígeno" se refiere a: 60 cualquier parte de una proteína (péptido, proteína parcial, proteína de longitud completa), en el que la proteína es una proteína de origen natural o sintética, a una composición celular (célula completa, lisado celular o células alteradas), a un organismo (organismo completo, lisado o células alteradas) o a un carbohidrato u otra molécula, o una parte de la misma, en el que el antígeno suscita una respuesta inmunitaria específica de antígeno (respuesta inmunitaria humoral y/o celular), o como alternativa actúa como un toleragénico, contra los mismos o similares a

antígenos que se encuentran dentro de las células y tejidos del animal al cual se administra el antígeno.

En una realización de la presente invención, cuando se deseé estimular una respuesta inmunitaria, el término "antígeno" puede usarse indistintamente con el término "inmunógeno", y se usa en el presente documento para

5 describir un antígeno que suscita una respuesta inmunitaria humorar y/o celular (es decir, es inmunogénica), de tal manera que la administración del inmunógeno a un animal (por ejemplo, mediante una vacuna de la presente invención) genera una respuesta inmunitaria específica de antígeno contra el mismo o similares antígenos que se encuentran dentro del tejido del animal. En otra realización, cuando sea deseable suprimir una respuesta inmunitaria contra un antígeno determinado, un antígeno puede incluir un tolerágeno. De acuerdo con la presente invención, un 10 "tolerágeno" se usa para describir un antígeno que se proporciona en forma, cantidad, o vía de administración tal que hay una respuesta inmunitaria reducida o cambiada contra el antígeno, y preferentemente ausencia de sensibilidad sustancial, anergia, otra activación o deleción de las células del sistema inmunitario en respuesta al contacto con el tolerágeno o una célula que exprese o presente dicho tolerágeno.

15 Un "antígeno de vacunación" puede ser un inmunógeno o un tolerágeno, pero es un antígeno usado en una vacuna, en el que se suscita una respuesta biológica (se suscita una respuesta inmunitaria, tolerancia) contra el antígeno de vacunación.

20 Un dominio inmunogénico (parte, fragmento, epítopo) de un antígeno determinado puede ser cualquier parte del antígeno (por ejemplo, un fragmento peptídico o subunidad o un epítopo del anticuerpo u otro epítopo conformacional) que contiene al menos un epítopo que actúa como un inmunógeno (o tolerágeno, para un domino toleragénico) cuando se administra a un animal. Por ejemplo, una sola proteína puede contener múltiples dominios inmunogénicos diferentes. Los dominios inmunogénicos no requieren ser secuencias lineales en una proteína, en el caso de una respuesta humoral.

25 En términos genéricos, un epítopo se define en el presente documento como un solo sitio inmunogénico dentro de un antígeno determinado que es suficiente para suscitar una respuesta inmunitaria, o un solo sitio toleragénico dentro de un antígeno determinado que es suficiente para suprimir, delecionar o volver inactiva a una respuesta inmunitaria. Como se ha indicado anteriormente, los expertos en la técnica reconocerán que los epítopos de linfocitos T son diferentes en cuanto a tamaño y composición de los epítopos de linfocitos B y que los epítopos presentados a través de la ruta MHC de Clase I se diferencian de los epítopos presentados a través de la ruta de MHC de Clase II. Los epítopos pueden ser de secuencia lineal o pueden ser epítopos conformacionales (regiones de unión conservadas), dependiendo del tipo de respuesta inmunitaria. Un antígeno puede ser tan pequeño como un solo epítopo, o mayor, y puede incluir epítopos múltiples. Como tal, el tamaño de un antígeno puede ser tan 30 pequeño como aproximadamente 5-12 aminoácidos (por ejemplo, un péptido) y tan grande como: una proteína de longitud completa, que incluye un multímero y proteínas de fusión, proteínas químéricas, células enteras, microorganismos enteros o partes de los mismos (por ejemplo, lisados de células enteras o extractos de microorganismos).

40 Composiciones y formulaciones de la invención

Las proteínas ZnT8, homólogos (incluyendo péptidos alterados), fragmentos, péptidos, miméticos peptídicos y no peptídicos y anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden incluirse en composiciones, formulaciones y particularmente vacunas útiles en la presente invención. Dichas composiciones, formulaciones o vacunas, pueden incluir un transportador farmacéuticamente aceptable, que incluya excipientes y/o vehículos de administración farmacéuticamente aceptables. Como se usa en el presente documento, un vehículo farmacéuticamente aceptable se refiere a cualquier sustancia idónea para administrar una composición, formulación o vacuna útil en el método de la presente invención en un sitio adecuado *in vivo* o *ex vivo*. Los vehículos farmacéuticamente aceptables preferidos son capaces de conservar el agente a administrar (por ejemplo, proteínas 45 ZnT8, homólogos (incluyendo péptidos alterados), fragmentos, péptidos, miméticos peptídicos y no peptídicos y anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) en una forma que, después de la llegada del agente a una célula diana o sitio diana, el agente sea capaz de actuar en esa célula o sitio (por ejemplo, sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria). Los excipientes adecuados de la presente invención incluyen excipientes o formulaciones que transportan o ayudan al transporte, pero no conducen específicamente un agente a un sitio 50 (también denominados en el presente documento vehículos no diana). Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, agua, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de dextrosa, soluciones que contienen suero, solución de Hank, otras soluciones acuosas fisiológicamente equilibradas, aceites, ésteres y glicoles. Los vehículos acuosos pueden contener sustancias auxiliares adecuadas necesarias para aproximar las condiciones fisiológicas del receptor, por ejemplo, potenciando 55 la estabilidad e isotonicidad química. Las sustancias auxiliares adecuadas incluyen, por ejemplo, acetato sódico, cloruro sódico, lactato sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico y otras sustancias usadas para producir tampón fosfato, tampón Tris y tampón bicarbonato. Las sustancias auxiliares también pueden incluir conservantes, tales como timerosal, m- u o-cresol, formalina y alcohol benzol. Las composiciones de la presente invención pueden 60 esterilizarse mediante métodos convencionales y/o liofilizarse.

Un tipo de un transportador farmacéuticamente aceptable incluye una formulación de liberación controlada que puede liberar lentamente una composición de la presente invención en un animal. Como se usa en el presente documento, una formulación de liberación controlada comprende un agente útil en la presente invención en un vehículo de liberación controlada. Los vehículos de liberación controlada adecuados incluyen, sin limitación, 5 polímeros biocompatibles, otras matrices poliméricas, cápsulas, microcápsulas, micropartículas, preparaciones en bolo, bombas osmóticas, dispositivos de difusión, liposomas, lipoesferas, y sistemas de administración transdérmicos. Los vehículos de administración adecuados también incluyen, pero sin limitación liposomas, vectores 10 virales y otros vehículos de administración, incluyendo ribozimas. Los vehículos de administración que contienen lípidos naturales incluyen células y membranas celulares. Los vehículos de administración que contienen lípidos artificiales incluyen liposomas y micelas. Un vehículo de administración de la presente invención puede modificarse 15 para dirigirse a un sitio particular en un paciente, conduciendo por lo tanto y utilizando un agente en ese sitio. Las modificaciones adecuadas incluyen la manipulación de las fórmulas químicas de la parte lipídica del vehículo de suministro y/o introducir en el vehículo un agente diana capaz de dirigir específicamente un vehículo de suministro a un sitio preferido, por ejemplo, un tipo de célula preferida.

Una vacuna es un tipo de composición específica que se usa para inmunizar o tolerizar un animal contra un antígeno particular. Por consiguiente, una vacuna comprende al menos un compuesto o agente que suscita una respuesta inmunitaria contra un antígeno o una parte inmunogénica o toleragénica del mismo, como resultado de la administración de la vacuna. La administración de una vacuna preferentemente produce un efecto protector o terapéutico, en el que la exposición posterior al antígeno (o a una fuente del antígeno) suscita una respuesta inmunitaria contra el antígeno (o fuente) que reduce o previene una enfermedad o afección en el animal. Dichas respuestas inmunitarias pueden generalmente potenciar o suprimir la respuesta inmunitaria contra el antígeno y en el caso de ZnT8, se prefiere que una vacuna suprima una respuesta inmunitaria contra ZnT8 y/o las células β de los islotes pancreáticos. El concepto de vacunación es bien conocido en la técnica. La respuesta inmunitaria que se suscita por la administración de una composición terapéutica de la presente invención puede ser cualquier cambio detectable en cualquier faceta de la respuesta inmunitaria (por ejemplo, respuesta celular, respuesta humorral, producción de citocinas), en comparación con la ausencia de la administración de la vacuna.

Métodos de la invención

La presente invención también incluye diversos métodos que utilizan la identificación de ZnT8 como un nuevo autoantígeno implicado en la diabetes de tipo I (DT1). Dichos métodos incluyen ensayos diagnósticos y ensayos usados para controlar la progresión de la enfermedad o eficacia de tratamiento, así como métodos profilácticos y terapéuticos, incluyendo métodos inmunoterapéuticos y estrategias de vacunación. ZnT8 también puede usarse 30 como una nueva diana para identificar compuestos útiles para el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de la DT1. Los métodos de la invención utilizan cualquiera de las proteínas ZnT8, péptidos, miméticos, homólogos, anticuerpos 35 o incluso moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente. En algunas realizaciones, dichos agentes se combinan con otros restos diagnósticos o terapéuticos para aumentar la eficacia de un método. Por ejemplo, la detección de otros autoantígenos además de ZnT8 (por ejemplo, insulina, antígeno insulinómico, y/o ácido glutámico 40 descarboxilasa) pueden combinarse con la detección de ZnT8 para ampliar la eficacia, sensibilidad y especificidad de un ensayo diagnóstico y diversos restos terapéuticos (por ejemplo, toxinas, agentes antiinflamatorios, antígenos) pueden combinarse con o unirse a agentes ZnT8 para potenciar un efecto terapéutico en los pacientes.

Por consiguiente, una realización de la invención se refiere a un método y ensayo para detectar la autoinmunidad 45 relacionada con la diabetes (es decir, diabetes de tipo I o DT1). Dicho ensayo puede usarse como un ensayo diagnóstico (por ejemplo, para identificar un paciente o un grupo de sujetos que están en desarrollo de DT1 o predecir la susceptibilidad a DT1) o como un ensayo pronóstico/de control. El último ensayo puede usarse para controlar la progresión de autoinmunidad en un paciente o grupo de sujetos a partir de una indicación benigna inicial 50 (no destructora) de una respuesta autoinmunitaria para destruir la insulitis que indica DT1 abierta. El último ensayo también puede usarse para controlar la eficacia de tratamientos que se dirigen a la prevención y/o tratamiento o mejora de autoinmunidad en sujetos prediabéticos. Por ejemplo, a los sujetos se les puede administrar uno o más 55 agentes inmunosupresores o preventivos, incluyendo, sin limitación, agentes basados en la propia molécula ZnT8 y después puede controlarse la progresión o no progresión a DT1 usando un ensayo de la invención. El ensayo puede basarse en la detección de respuestas de autoanticuerpo contra ZnT8 en el sujeto o en la detención en el sujeto de la reactividad de linfocitos T contra el epítopo o epítopos antigenéticos de ZnT8. Los ensayos pueden usarse por separado o juntos entre sí.

En una realización, la invención incluye un ensayo, con anticuerpos, que detectan la presencia o ausencia de 60 anticuerpos que se unen específicamente a ZnT8 en el sujeto. El método de la invención puede usarse para identificar eficazmente o seleccionar pacientes que, basándose en el nivel de anticuerpos contra ZnT8 en el suero del paciente, probablemente desarrollan, o están desarrollando, la diabetes de tipo I, incluyendo predecir factores tales como el tiempo de aparición o el control de la progresión o fase de la enfermedad. El método también puede usarse para identificar o seleccionar eficazmente pacientes que responden o no responden a un procedimiento terapéutico particular (es decir, el método se usa para indicar o contraindicar un procedimiento terapéutico para un paciente particular).

En un aspecto del ensayo de autoanticuerpos de la invención, los isoepítopos específicos definidos por los

- polimorfismos en el gen de ZnT8 y proteína se detectan. El diagnóstico de la especificidad isoepitópica puede realizarse con un solo ensayo diagnóstico que puede basarse en la unión del anticuerpo al ligando específico, sea como la proteína intacta o un péptido derivado de la misma. Análisis adicionales de especificidad pueden realizarse determinando la capacidad de cantidades en exceso de las variantes específicas de la proteína o péptidos derivados para competir con la interacción del anticuerpo con el ligando. La plataforma analítica de dichos ensayos puede ser radioinmunoprecipitación, ELISA, luminiscencia con fluorescencia resuelta en tiempo o diversos otros formatos de ensayo genéricos.
- El método generalmente incluye detectar autoanticuerpos que se unen selectivamente a ZnT8 en un paciente o muestra del sujeto (muestra de ensayo) usando cualquier técnica adecuada. El nivel de unión de anticuerpos del paciente puede estandarizarse frente a un control positivo (por ejemplo, un control de suero positivo) y compararse con un límite determinado o predeterminado experimentalmente (nivel de control negativo) para el antígeno (ZnT8) y ensayo, para determinar si la muestra de ensayo contiene un nivel de anticuerpos anti-ZnT8 que es clínicamente o de otra manera relevante. El ensayo puede incluir la capacidad de explorar autoantígenos adicionales distintos de ZnT8, incluyendo pero sin limitación, insulina, antígeno asociado a insulinoma, y ácido glutámico descarboxilasa.
- Este método o ensayo de la invención incluye más particularmente proporcionar un antígeno de ZnT8 contra el cual pueden detectarse anticuerpos del paciente. El antígeno ZnT8, puede ser cualquier antígeno derivado de ZnT8 adecuado incluyendo la proteína ZnT8 de longitud completa, o un homólogo o fragmento, proteína de fusión, péptido alterado o péptido mimético del mismo, que detecta anticuerpos del suero contra ZnT8 en un paciente. El antígeno ZnT8 contiene al menos un epítopo de anticuerpo. Un antígeno ZnT8 particularmente preferido es un péptido C-terminal de la proteína ZnT8, que se ha descrito con detalle anteriormente.
- De acuerdo con la presente invención, se realiza un ensayo en condiciones que son eficaces para explorar anticuerpos de acuerdo con los usos que se pretenden de esta información como se describe en el presente documento. Las condiciones eficaces incluyen, sin limitación, medios, temperatura, pH y condiciones de oxígeno apropiados que permiten el crecimiento celular. Generalmente, una muestra de ensayo del paciente se pone en contacto con el antígeno ZnT8 en condiciones de competitividad o no competitividad y la unión de los autoanticuerpos en la muestra de ensayo con el antígeno ZnT8 se detecta, cuantifica y compara con un control negativo y/o positivo. Las técnicas usadas para detectar autoanticuerpos contra ZnT8 en la muestra pueden incluir cualquier ensayo adecuado, incluyendo pero sin limitación: ELISA (directa o indirecta), ensayos de radioinmunoprecipitación, ensayos de fluorescencia y luminiscencia resuelta en tiempo. Dichos formatos de ensayo son bien conocidos en la técnica.
- Un ensayo preferido para su uso en esta realización de la invención es un ensayo competitivo con Europio. Dicho ensayo se ha descrito con detalle en la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 60/822.786, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Este método generalmente incluye realizar un ensayo competitivo con anticuerpos, en el que el método de detección usa fluorescencia de Europio. El método incluye más particularmente las etapas de inmovilizar el agente al cual el anticuerpo del sujeto se une selectivamente con un sustrato, tal como el pocillo de una placa de ensayo u otro sustrato adecuado; bloquear los sitios de unión no específicos sobre el sustrato; aplicar una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra de suero de un sujeto que se va a evaluar con respecto a anticuerpos) a la placa, en el que la muestra de ensayo se ha incubado previamente en presencia y en ausencia de una forma fluida del antígeno (es decir, etapa de competición); y finalmente, detectar la unión del anticuerpo con el antígeno inmovilizado usando un sistema de detección basado en Europio, tal como un anticuerpo secundario conjugado con un agente (por ejemplo, biotina), seguido de un segundo agente que se une al primer agente (por ejemplo, estreptavidina) que está marcado con Europio. El nivel de fluorescencia emitida por el Europio puede después detectarse usando métodos de detección convencionales. Dado que el ensayo es un ensayo competitivo, los recuentos de fluorescencia de la muestra que se ha incubado previamente con el antígeno se restan de los recuentos de fluorescencia de la muestra que no se incubó previamente con el antígeno para proporcionar el nivel resultante. Este nivel puede estandarizarse frente a un control de suero positivo y compararse con un límite determinado o predeterminado experimentalmente (nivel de control negativo) para el antígeno y ensayo, para determinar si la muestra de ensayo contiene un nivel de anticuerpos que sea clínicamente o de otra manera relevante.
- De acuerdo con la presente invención, la expresión "muestra de ensayo" puede usarse generalmente para referirse a una muestra de cualquier tipo que se piensa que contiene o que puede contener los anticuerpos a detectar por la presente invención. Una muestra de ensayo puede incluir una muestra preparada, tal como una muestra que provenga de una muestra natural o se produzca sintéticamente, y es más preferentemente una muestra biológica obtenida de un sujeto de ensayo (individuo, paciente, animal). Una muestra puede por lo tanto incluir un sobrenadante celular, fluido corporal, tejido u otros medios que pueden contener un anticuerpo a detectar. Los fluidos corporales adecuados para el muestreo incluyen, sin limitación, sangre, moco y leche materna y más preferentemente una muestra de sangre o suero, prefiriéndose particularmente el suero.
- Como se ha indicado anteriormente, un ensayo de la invención puede formatearse para detectar una especificidad de anticuerpo (es decir, ZnT8), más de una (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) especificidad de anticuerpo (es decir, detección de anticuerpos que se unen a diferentes antígenos o a diferentes epítopos del mismo antígeno o

combinaciones de los mismos) o múltiples especificidades de anticuerpo (>10). En otras palabras, el método se formatea para detectar uno, más de uno, o múltiples diferentes anticuerpos en un solo ensayo o experimento (por ejemplo, poniendo diferentes antígenos y/o epítopos de un antígeno (un panel de antígenos y/o epítopos) en diferentes pocillos de una sola placa o sustrato de ensayo, de tal manera que el ensayo explora una sola muestra para tantos diferentes anticuerpos como se necesite). Además, el ensayo puede formatearse para explorar múltiples sujetos de una manera a alto rendimiento, para obtener información con respecto a una población de sujetos.

El método de la presente invención tiene diferentes usos. El método de la invención puede usarse para detectar anticuerpos en una muestra para cualquier fin útil, incluyendo tanto fines clínicos (por ejemplo diagnóstico, de pronóstico y terapéutico) como de investigación. El método de la invención puede realizarse usando muestras de seres humanos o de animales no humanos. En primer lugar, el método puede usarse para diagnosticar DT1, o lo que es más importante la posibilidad de desarrollar o el tiempo hasta que aparece el desarrollo de DT1 en un sujeto. El sujeto puede ser un individuo que se sospecha que tiene DT1, que se sabe que está predisposto a DT1 o un individuo que se presume que es sano, pero que va a someterse a una exploración de rutina o de diagnóstico. El sujeto también puede ser un individuo al que previamente se le ha diagnosticado DT1 y cuyo tratamiento se ha iniciado, y que está ahora bajo supervisión para detectar la progresión de DT1. Los términos "diagnóstico", "diagnosis", "diagnosticar" y sus variantes se refieren a la identificación de una enfermedad o afección basándose en sus señales y síntomas. Como se usa en el presente documento, un "diagnóstico positivo" indica que la enfermedad o afección, o potencial para desarrollar la enfermedad o afección, se ha identificado. Por otro lado, un "diagnóstico negativo" indica que la enfermedad o afección, o un potencial para desarrollar la enfermedad o afección, no se ha identificado.

En otra realización de la invención, el método puede usarse para seleccionar un paciente que está previsto que se beneficie o no se beneficie de un procedimiento terapéutico para la DT1. De manera similar, el método puede usarse para indicar o contraindicar un procedimiento terapéutico particular para un paciente específico. En esta realización, el método generalmente incluye las etapas de:

(a) realizar el método de la presente invención para detección de un anticuerpo como se describe con detalle en el presente documento; (b) comparar el nivel del anticuerpo en la muestra del paciente con un nivel de control del anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

(1) un nivel de control del anticuerpo que se ha correlacionado con sensibilidad hacia el procedimiento terapéutico; y
 (2) un nivel de control del anticuerpo que se ha correlacionado con ninguna sensibilidad hacia el procedimiento terapéutico; y (c) seleccionar el paciente que se ha previsto que se beneficie del procedimiento terapéutico, si el nivel del anticuerpo en la muestra del paciente es estadísticamente más similar al nivel de control del anticuerpo que se ha correlacionado con la respuesta al procedimiento terapéutico en comparación con el nivel de control del anticuerpo que se ha correlacionado con ninguna sensibilidad del procedimiento terapéutico; o (d) seleccionar el paciente que se ha previsto que no se beneficia del procedimiento terapéutico, si el nivel del anticuerpo en la muestra del paciente es estadísticamente más similar o menor que el nivel del anticuerpo que se ha correlacionado con ninguna sensibilidad hacia el procedimiento terapéutico que con el nivel de control del anticuerpo que se ha correlacionado con sensibilidad hacia el procedimiento terapéutico. Por ejemplo, dicho método puede ser útil para indicar o contraindicar la administración de un agente antiinflamatorio en el paciente o la administración de un agente que se dirige selectivamente a ZnT8 u otro autoantígeno o su expresión. Otros aspectos de esta realización serán obvios para los expertos en la técnica.

Un diagnóstico o pronóstico positivo con respecto a la detección de un anticuerpo usando el método de la invención indica que el anticuerpo está presente en la muestra a un nivel que es estadísticamente significativo por encima de un nivel experimentalmente determinado o predeterminado negativo o "normal" del anticuerpo en una muestra del mismo tipo (es decir, el nivel "normal" es un nivel de detección del anticuerpo que se encuentra o es un promedio de lo que se encuentra en sujetos que no tienen DT1). Para establecer un diagnóstico o pronóstico positivo, el nivel del anticuerpo detectado en la muestra de ensayo está aumentado sobre la línea basal establecida o determinada por una cantidad que es estadísticamente significativa (es decir, con al menos un nivel de confianza del 95 %, o $p<0.05$). Los métodos de estandarización o creación de un "índice" de niveles de anticuerpo en una muestra, se conocen en la técnica. Un diagnóstico o pronóstico negativo con respecto a la detección de un anticuerpo usando el método de la invención indica que el anticuerpo es no detectable en la muestra o está presente a un nivel que no es estadísticamente significativo más alto que (y puede ser más bajo que) el nivel que es estadísticamente significativo por encima de un nivel negativo o "normal" experimentalmente determinado o predeterminado del anticuerpo en una muestra del mismo tipo.

Otra realización más de la invención incluye un ensayo con linfocitos T, que detecta la presencia o ausencia de células T en un sujeto que se une específicamente a ZnT8. Al igual que con los ensayos de anticuerpos indicados anteriormente, este método de la invención puede usarse para identificar o seleccionar eficazmente pacientes que, basándose en el nivel de respuesta de células T contra ZnT8 en el suero del paciente, desarrollan más probablemente, o está desarrollando, la diabetes de tipo I, incluyendo predecir factores tales como tiempo de aparición, o control de la progresión de fase de enfermedad. El método también puede usarse para identificar o seleccionar eficazmente pacientes que responden o no a un procedimiento terapéutico particular (es decir, el método se usa para indicar o contraindicar un procedimiento terapéutico para un paciente particular).

En un aspecto de esta realización, el método incluye la detección de isoepitopos descritos en el presente documento

- con respecto a los polimorfismos de ZnT8. Los ensayos pueden diferenciar entre péptidos pequeños, normalmente de 8 a 20 aminoácidos de longitud que codifican la secuencia de proteína que incluye regiones variantes o regiones invariantes de la molécula. Dichas respuestas a células T se controlan normalmente en sangre periférica pero pueden aplicarse a poblaciones de linfocitos obtenidas de otras partes del organismo. La plataforma analítica para dichos ensayos puede basarse en la proliferación, producción de citocinas u otros marcadores de activación que están en su superficie o en marcadores de proteína intracelulares o lípidos o carbohidratos. La interpretación de estos ensayos normalmente también implicará el conocimiento del genotipo de HLA de clase I y de clase II del individuo.
- 5 10 En estas realizaciones de la invención, un antígeno de ZnT8 que contiene al menos un epítopo de célula T de ZnT8 se proporciona en un ensayo que detecta respuestas a linfocitos T (células T) específicos de ZnT8 en una muestra de ensayo de un paciente. Las proteínas ZnT8 y los antígenos, que incluyen epítopos de células T, se han analizado con detalle anteriormente. Por ejemplo, en una realización, los productos de sistemas de traducción *in vitro* son útiles en los presentes ensayos. El formato de ensayo puede ser cualquier ensayo adecuado de linfocitos T para un antígeno, incluyendo, sin limitación, ensayos de proliferación con linfocitos T, ensayos usando reactivos tetraméricos de MHC de clase I y clase II, ensayos de citometría de flujo y ensayos ELISPOT. Por consiguiente, los ensayos adecuados pueden incluir ensayos basados en células y ensayos no basados en células. En el último caso, pueden usarse receptores de células T solubles, por ejemplo, en la unión o inmunoensayos para detectar antígenos ZnT8 unidos a moléculas MHC solubles (por ejemplo, reactivos tetraméricos). En el primer caso, la unión de un antígeno a receptores de células T sobre la superficie de una célula se detecta, normalmente detectando la proliferación de o la producción de citocinas por la célula. Además como en los ensayos con anticuerpos, los ensayos de células T de la invención pueden usarse para detectar más de uno o múltiples autoantígenos en una muestra del paciente, y/o detectar respuestas a células T en múltiples sujetos.
- 15 20 Al igual que con los ensayos de anticuerpos, un diagnóstico o pronóstico positivo con respecto a la detección de respuestas de células T a ZnT8 indica que las células T específicas de ZnT8 (células T autorreactivas) están presentes en la muestra del paciente a un nivel que está estadísticamente de un modo significativo por encima de un nivel experimentalmente determinado o predeterminado negativo o "normal" de dichas respuestas a células T en una muestra del mismo tipo (es decir, el nivel "normal" es un nivel de respuestas de células T que se encuentra o es un promedio del que se encuentra en sujetos que no tienen DT1). Para establecer un diagnóstico o pronóstico positivo, el nivel de respuestas de células T específicas de ZnT8 detectado en la muestra aumenta sobre el nivel basal establecido o determinado en una cantidad que es estadísticamente significativa (es decir con al menos un nivel de confianza del 95 %, p<0,05). Los métodos de estandarización, o creación de un "índice" de niveles de respuesta de células T específicas de ZnT8 en una muestra son conocidos en la técnica. Un diagnóstico o pronóstico negativo con respecto a la detección de respuestas de células T específicas de ZnT8 usando el método de la invención indica que la respuesta de células T específicas de ZnT8 no es detectable en la muestra o está presente a un nivel que no es estadísticamente significativo mayor que (y que puede ser menor que) un nivel que es estadísticamente significativo por encima de un nivel experimentalmente determinado o predeterminado negativo o "normal" de dichas respuestas en una muestra del mismo tipo.
- 25 30 En la presente invención se incluyen kits para realizar cualquiera de los métodos diagnósticos como se describe anteriormente. El kit incluye (a) un antígeno ZnT8 (incluyendo cualquiera de las proteínas, péptidos o miméticos descritos anteriormente) para usar en el ensayo en fase fluida o inmovilizada en un sustrato (el antígeno puede proporcionarse ya inmovilizada o en una forma adecuada para la inmovilización); y (b) un reactivo o reactivos que se usan para detectar la unión de un anticuerpo con el antígeno y/o un reactivo o reactivos que se usan para detectar la unión de un receptor de células T con el antígeno (en un ensayo basado en células o no basado en células). Pueden también incluirse otros reactivos útiles para realizar el ensayo, tales como, sin limitación, tampones, anticuerpos secundarios, marcadores detectables y reactivos útiles para la lectura del ensayo, proteínas de unión solubles (por ejemplo, MHC soluble, receptores de células T solubles) y otros reactivos útiles.
- 35 40 Otra realización de la presente invención se refiere al desarrollo y uso de diversos reactivos basados en la identificación de ZnT8 como un importante autoantígeno en estrategias terapéuticas y preventivas para vacunar a un sujeto para prevenir, retrasar o mejorar la aparición de la diabetes de tipo I en un individuo para suprimir o destruir las respuestas de células T autorreactivas contra las células β de los islotes pancreáticos y/o para modificar una respuesta inmunitaria contra las células β de los islotes pancreáticos a partir de una respuesta destructora a una respuesta menos destructora o más protectora.
- 45 50 En una realización, las proteínas ZnT8, péptidos, homólogos, miméticos, anticuerpos ZnT8 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos y/u otros agentes derivados de ZnT8 o basados en ZnT8 (incluyendo formas química o físicamente modificadas del péptido o anticuerpos) se administran *ex vivo* o *in vivo* a un sujeto para alterar el transcurso del desarrollo de DT1, o la aparición y/o inducir una respuesta a linfocitos T específica de ZnT8 en un sujeto que sea toleragénica o protectora, en lugar de destructora. En una realización, dichos agentes se administran como una vacuna. Dichos agentes/reactivos relacionados con ZnT8 se han descrito anteriormente.
- 55 60 En otra realización, los reactivos específicos de antígeno basados en ZnT8 que se han diseñado para dirigir células T autorreactivas específicas de ZnT8 se administran a un sujeto en combinación con un agente que induce la

- apoptosis o de otra manera es tóxico para las células. Este método puede realizarse *in vivo* o *ex vivo*. Por ejemplo, moléculas MHC solubles que forman un surco de unión peptídico (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.820.866) se unen con un péptido antigénico o toleragénico de ZnT8 (incluyendo péptidos alterados y homólogos de ZnT8 que se unen al MHC y pueden suscitar una respuesta de células T de acuerdo con esta 5 realización). Dichos complejos pueden formar posteriormente complejos con (mediante cualquier técnica covalente o no covalente) una toxina u otro agente que inducirá necrosis o apoptosis de células T cuando las células T se unan al complejo péptido-MHC mediante sus receptores de células T.
- Las toxinas adecuadas para su uso en la presente invención como agentes para formar complejos (conjugarse, 10 acoplarse) con péptidos ZnT8 y homólogos incluyen cualquier toxina o proteína, agente o molécula que sea tóxico para una célula (necrótico o apoptótico), e incluye cualquier toxina que puede usarse en un entorno terapéutico como se describe en el presente documento. Estas toxinas incluyen, sin limitación, el ligando Fas, la proteína antiviral de filotaca, toxina botulínica, ricino, etc.
- Adicionalmente, el conocimiento que puede obtenerse a partir de análisis genéticos, de autoanticuerpos y de células 15 T descritos en el presente documento puede aplicarse para tomar decisiones acerca del uso de un régimen terapéutico específico. Dicho régimen podría basarse en agentes no relacionados con ZnT8 o Slc30A8 o agentes específicos de antígeno tales como la proteína ZnT8 recombinante, péptidos derivados de ZnT8 en solitario o unidos con otro agente, por ejemplo toxina, una célula tal como un linfocito, una proteína tal como una molécula de HLA o 20 inmunoglobulina) o ADN de Slc30A8 en solitario o unido con otro agente. El tratamiento podría basarse en el antígeno o ácidos nucleicos que lo codifican o inhiben su expresión y podría ajustarse para hacer coincidir el isoepítopo o hacerlo que no coincida dependiendo del resultado deseado. El emparejamiento del isoepítopo con el paciente que tiene autorreactividad puede proteger por inducción un estado de tolerancia. Por otro lado, el 25 emparejamiento erróneo podría ser una forma de inmunización con la que también se aprovechan efectos beneficiosos. Será esencial al comienzo conocer el estado isoepítópico del individuo ya que determinará qué ruta seguir y qué isoforma del agente usar.
- Dichas estrategias terapéuticas estarían relacionadas con ensayos diagnósticos dirigidos a ensayar la eficacia del agente terapéutico. Dichos diagnósticos serían en algunos casos una repetición de los ensayos de autoanticuerpos y 30 de células T mencionados anteriormente; sin embargo algunos de los reactivos que se generan pueden aplicarse a objetivos específicos de enfermedad. Por ejemplo, un isoepítopo que contiene o que codifica un agente terapéutico puede usarse para acoplarse a un linfocito B con la intención de expandir, activar o anular el tipo de célula específico. La eficacia del tratamiento se puede evaluar siguiendo la población de tipo de célula diana y podría, por 35 ejemplo usarse un péptido isoepítópico acoplado a una enzima de molécula fluorescente para etiquetar la población de células T, que podría después enumerarse y caracterizarse fenonormalmente por citometría de flujo. Dichos procedimientos también podrían aplicarse al aislamiento de dicha población de células por procedimientos de selección o separación de células activadas por fluorescencia.
- Los agentes descritos anteriormente para su uso en métodos preventivos y terapéuticos de la invención pueden 40 administrarse en solitario, en una composición, formulación o vacuna y/o junto con la administración (junta o secuencial) de otros agentes útiles para la prevención o tratamiento de la DT1. Como se ha analizado anteriormente, una composición o agente de la presente invención se administra a un paciente de una manera eficaz para administrar el agente a una célula diana o a un sitio diana, de tal manera que el agente pueda actuar en el sitio y/o 45 puede tener un efecto sobre la célula. Los protocolos de administración idóneos incluyen cualquiera de los protocolos de administración *in vivo* o *ex vivo*. Un protocolo de administración eficaz (es decir, la administración de una composición o agente de la presente invención de una manera eficaz) comprende parámetros de dosis adecuados y modos de administración que dan como resultado la actividad deseada de la composición o agente en el sujeto o en la célula, tal como tolerancia de células T autorreactivas contra el autoantígeno ZnT8, apoptosis de 50 células T autorreactivas, prevención o reducción de insulitis y/o destrucción de las células β de los islotes y prevención, retraso en la aparición o mejora de la gravedad de DT1. Se prefiere que el paciente obtenga algún beneficio medible observable o percibido de dicha administración. Los parámetros de dosis eficaces pueden determinarse por experimentación, por ejemplo, usando cultivos de células *in vitro*, modelos animales *in vivo* y eventualmente, ensayos clínicos si el paciente es un ser humano. Los parámetros de dosis eficaces pueden 55 determinarse usando métodos convencionales en la técnica para una enfermedad o afección determinada que el paciente tiene o está en riesgo de desarrollar. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, la determinación de tasas de supervivencia, efectos secundarios (es decir, toxicidad) y aparición, progresión o regresión de la enfermedad.
- Las vías de administración incluyen vías *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Las vías *in vivo* incluyen, pero sin limitación, la 60 administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración intramuscular, administración intranodal, administración intracoronaria, administración intraarterial (por ejemplo, en una arteria carótida), administración subcutánea, administración transdérmica, administración intratraqueal, administración subcutánea, administración intraarticular, administración intraventricular, inhalación (por ejemplo aerosol), intracraneal, intraespinal, intraocular, aural, intrabasal, oral, administración pulmonar, impregnación de un catéter e inyección directa en un tejido. En una realización preferida de la presente invención, una composición se administra mediante una vía parenteral (por ejemplo vías subcutánea, intradérmica, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal). La administración intravenosa, 65 intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular puede realizarse usando métodos convencionales en la

- técnica. La administración ótica puede incluir gotas óticas, administración intranasal puede incluir gotas nasales o inyección intranasal y la administración intraocular puede incluir gotas oculares. La administración en aerosol (inhalación) también puede realizarse usando métodos convencionales en la técnica (véase, por ejemplo Stribling *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189: 11277-11281, 1992, que se incorpora por referencia en su totalidad). La administración oral puede realizarse formando un complejo de un agente o composición de la presente invención con un transportador capaz de soportar la degradación por enzimas digestivas en el intestino de un animal. Ejemplos de dichos transportadores incluyen cápsulas o comprimidos de plástico tales como se conocen en la técnica.
- 5 *Ex vivo* se refiere a realizar parte de la etapa reguladora fuera del paciente, tal como administrando un agente o composición a una población de células (o ponen en contacto las células con el agente o la composición), en el que las células se han eliminado de un paciente y devolviendo las células tratadas al paciente. Dichas células pueden incluir, por ejemplo, células T, en las que las células T se inducen para alterar su tipo de respuesta inmunitaria producido cuando se ponen en contacto con ZnT8 *in vivo*. Las vías de administración *in vivo* y *ex vivo* de una composición para un cultivo de células hospedadoras puede realizarse mediante un método que incluye, pero sin limitación, transfección, transformación, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción, fusión de protoplastos, uso de agentes transportadores de proteínas, uso de agentes transportadores de iones, uso de detergentes para la permeabilización celular y simplemente mezclando (por ejemplo, combinando) un compuesto en cultivo con una célula diana y/o una proteína diana.
- 10 Para las proteínas moléculas pequeñas (es decir los productos de diseño de fármacos) o anticuerpos, una dosis sencilla preferida de dicho agente comprende normalmente entre aproximadamente 0,01 microgramos x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 10 miligramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal. Una dosis sencilla más preferida de un agente comprende entre aproximadamente 1 microgramo x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 10 miligramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal. Una dosis sencilla incluso más preferida de un agente comprende entre 15 aproximadamente 5 microgramos x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 7 miligramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal. Una dosis sencilla incluso más preferida de un agente comprende entre aproximadamente 10 microgramos x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 5 miligramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal. Otra dosis sencilla particularmente preferida de un agente comprende entre aproximadamente 0,1 microgramos x kilogramo⁻¹ y aproximadamente 10 microgramos x kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal, si el agente se administra por vía parenteral.
- 20 Un beneficio preventivo o terapéutico resultante de un método descrito en el presente documento no es necesariamente una curación de una enfermedad o afección particular (por ejemplo, diabetes de tipo I), sino que también puede incluir un resultado que incluye mejor el retraso de la aparición de la prediabetes o DT1 abierta o mejora del aspecto destructor de la enfermedad de manera que la destrucción completa de los islotes se retrasa durante más de lo que podría esperarse en ausencia del tratamiento, permitiendo de este modo al paciente un tiempo más largo para completar la confianza de la terapia con insulina, otras intervenciones terapéuticas, y los impactos perjudiciales para la salud corriente abajo de la enfermedad. Como se usa en el presente documento, la frase "protegida de una enfermedad" se refiere a reducir los síntomas de la enfermedad; reducir la aparición o el inicio de la enfermedad, y/o reducir la gravedad de la enfermedad. La protección de un paciente puede referirse a la capacidad de un agente o una composición de la presente invención, cuando se administra a un paciente, para prevenir que ocurra una enfermedad y/o curar o aliviar los síntomas, signos o causas de la enfermedad. Como tal, proteger a un paciente de una enfermedad incluye tanto la prevención o el retraso de que se produzca la enfermedad (tratamiento profiláctico) como el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad o una preenfermedad (tratamiento terapéutico). El término "enfermedad" se refiere generalmente a cualquier desviación de la salud normal de un mamífero e incluye un estado en el que los síntomas de la enfermedad están presentes, así como afecciones en las que se ha producido una desviación (destrucción de células β de los islotes), pero los síntomas aún no se han manifestado.
- 25 35 40 45 50 55 60 65 Otra realización de la invención se refiere a un método para identificar un compuesto útil en un ensayo de diagnóstico como se describe en el presente documento o en un método preventivo o terapéutico de la invención como se describe en el presente documento. Dicho método incluye las etapas de poner en contacto un agente basado en ZnT8 (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico de ZnT8, un péptido o una proteína, un homólogo mimético o anticuerpo o fragmento del mismo, o un receptor de células T específico de ZnT8) con un supuesto compuesto regulador, y detectar una interacción y/o efecto resultante de la interacción entre el supuesto compuesto regulador y el agente basado en ZnT8. Dichos ensayos pueden basarse en células o no basarse en células. Por ejemplo, se pueden identificar anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unan selectivamente a ZnT8 usando las proteínas ZnT8 descritas anteriormente (incluyendo fragmentos y homólogos de las mismas). Se pueden usar anticuerpos ZnT8 o receptores de células T específicos de ZnT8 para identificar homólogos, péptido miméticos, péptidos alterados y fragmentos de ZnT8 que serán útiles en un ensayo diagnóstico o terapéutico. Los reactivos basados en ZnT8 pueden usarse para diseñar nuevos reactivos sintéticos, incluyendo miméticos, para su uso en los métodos diagnósticos o terapéuticos descritos en el presente documento. También pueden usarse moléculas de ácido nucleico de ZnT8, proteínas, péptidos, miméticos o anticuerpos para identificar diversos compuestos reguladores que pueden suprimir o alterar una respuesta inmunitaria contra ZnT8 en un individuo.

Las etapas de dicho método generalmente incluyen poner en contacto un agente basado en ZnT8 con un compuesto regulador potencial, y medir un efecto sobre el agente basado en ZnT8 o células en el ensayo, tal como detectando la transcripción de ARN de ZnT8 (por ejemplo, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), hibridación *in situ*, transferencia de Northern, análisis de secuencias o detección de un gen indicador); detectando la traducción de ZnT8 (por ejemplo, por inmunotransferencia, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia); y/o detectar la actividad biológica de ZnT8 (por ejemplo, detectando cualquiera de las actividades de ZnT8 como se describe en el presente documento, o detectando la inhibición o supresión de dichas actividades). Los compuestos detectados en este método pueden usarse en métodos de diagnóstico, preventivos o terapéuticos descritos en el presente documento.

De acuerdo con la presente invención, los métodos y ensayos descritos en el presente documento son idóneos para el uso en pacientes que es un miembro de la clase de vertebrados mamíferos incluyendo sin limitación, primates, ganado y animales domésticos (por ejemplo, un animal de compañía). Más normalmente, un paciente será un paciente humano.

Ejemplos

Ejemplo 1

El siguiente ejemplo describe la identificación inicial de ZnT8 (también conocido como Slc30a8) como un nuevo autoantígeno de diabetes.

Los inventores realizaron experimentos con micromatrices oligonucleotídicas usando microplacas de Affymetrics U133 humana y MOE430 de ratón que incluyen prácticamente todo el genoma así como el Panchip 5.0 que indica los transcritos génicos en el páncreas de ratón. Los datos se habían obtenido de islotes aislados de ratones normales, modelos diabéticos (NOD y *ob/ob*) y ratones con deficiencias en el gen IAPP y Ngn 3 así como de líneas de células tumorales pancreáticas de ratón (α TC1-6 glucagonoma, β TC3 e insulinomas Min6 y línea tumoral ductal mPAC). Los datos se habían analizado para destacar los transcritos que presentan expresión específica del tipo de célula de islote y su segregación entre células α y β pancreáticas. Se han usado análisis posteriores basados en anotaciones de ontología génica (OG) para generar listas de genes de seres humanos y ratón de autoantígenos candidatos. De los 10 candidatos con mayores puntuaciones, 5 son autoantígenos de diabetes conocidos e impulsó a los inventores a realizar un experimento de prueba de principio en uno de los transcritos de alta puntuación (correspondiente a ZnT8) como una diana de autoinmunidad humoral en sujetos humanos con DT1 de nueva aparición. Un ensayo serológico desarrollado para este candidato detectó inmunorreactividad en el 20 % de sujetos diabéticos y ninguno de los controles (<2,5 %). La propuesta actual busca examinar este y otros candidatos génicos en estos listados usando ensayos de autoinmunidad tanto humoral como mediada por células.

Específicamente, la llegada de micromatrices génicas que incluyen casi el espectro completo de los ARNm de ratón codificados (transcritoma) ha permitido la identificación de los subconjuntos de genes que se expresan en los islotes pancreáticos. Diversos estudios publicados han documentado genes que se expresan en tejido de islote pancreático, tipos de células específicas de islotes y líneas celulares derivadas de islotes (67) (Shalev, 2002) (68). Además, estudios realizados han descrito las respuestas de islotes a manipulación fisiológica y patofisiológica tales como estimulación con glucosa o citocinas inflamatorias *in vitro* y de ratones portadores de genes mutantes que afectan a la función o desarrollo pancreático. Desgraciadamente, no se dispone actualmente de la mayoría de estos datos a través de las bases de datos de dominio público depositarias centrales o está en diversas plataformas de micromatriz que hace que estos datos sean difíciles de normalizar. Los inventores han realizado más de 50 experimentos de micromatriz usando microplacas de oligonucleótidos U133 de ser humano y MOE430 de ratón que describen prácticamente todos los transcritos de cada especie. Esto incluye datos de ratones normales, modelos diabéticos (NOD y *ob/ob*) y ratones con deficiencias en el gen IAPP y Ngn 3. El último está desprovisto completamente de células endocrinas pancreáticas y por tanto el análisis a diferentes momentos gestacionales ha permitido la identificación de transcritos que se expresan altamente en las células endocrinas con respecto al tejido exocrino y ductal a lo largo del desarrollo (69). Estos datos se han comparado con datos de matrices y datos de secuenciación de dbEST de un gran conjunto de tejido no pancreático de 45 tipos de tejidos (conjunto de datos de Novartis y perfiles de expresión de Unigene). El análisis de líneas celulares tumorales pancreáticas de ratón (glucagonoma α TC1-6, insulinomas β TC3 y Min6 y línea de tumor ductal mPAC) han permitido adicionalmente la generación de puntuaciones predictivas para seleccionar transcritos que probablemente presentan expresión específica del tipo de célula de islote, y su segregación entre células α y β pancreáticas. Estas líneas celulares expresan genes relacionados con el fenotipo de células tumorales y por tanto se realizaron también análisis sobre células β pancreáticas aisladas de un ratón transgénico que expresaba el autoantígeno fogrina vinculado a EGFP bajo el promotor de insulina 2 de rata. La Tabla 2 enumera alguno de los genes para los cuales se definen transcritos por análisis ANOVA, en primer lugar expresándose diferencialmente en ratones de tipo silvestre Ngn3 y genosuprimidos en cualquier edad embrionaria (endocrina pancreática y precursores) y en segundo lugar presente en islotes de ratones adultos. El listado se estratificó después basándose en la expresión relativa en las líneas de células α TC y β TC. Estas estrategias pronosticaron satisfactoriamente la especificidad de las células de los islotes

de la mayoría de los componentes reguladores transcripcionales conocidos implicados en el desarrollo de los islotes, tales como *Ipf1*, *Arx*, *Pax4*, *Pax6*, *Brn4*, *NeuroD* y especificidad de tipo celular conocida de diversos genes de células α y β . Los transcriptos neuroendocrinos conocidos tales como *PTPRN* (IA-2), prohormona convertasas (*Pcsk1*, *Pcsk2*, *Cpe*) y las graninas (*Chga*, *Chgb* *Scg2*, *Sgne1*) estaban en un conjunto de transcriptos α TC y β TC comunes. Los genes asociados con otras células endocrinas de islotes no se expresaron, como se pronosticaba, en ninguna (*Ppy*, *Pyy* y *grelina*). Hubo algunas sorpresas entre genes conocidos, por ejemplo, la aparición del gen de la región cromosómica 14 del síndrome de Williams Beuren como un transcripto que muestra especificidad de células β . Este factor de transcripción es un regulador importante de enzimas glucolíticas y gluconeogénicas y está asociado con una forma de diabetes de tipo 2 de origen hepático (70). Normalmente se considera ampliamente distribuido. El uso complementario de análisis de hibridación *in situ* (datos no mostrados) indicaron que, de hecho, el transcripto se encuentra en la región del páncreas en desarrollo donde las células endocrinas aparecen y el páncreas adulto se confina a los islotes con una distribución coherente con la especificidad de células β .

Tabla 2. Se examinaron transcriptos génicos que se agotaron en el páncreas Ngn3 ko a e12,5, e15,5 o e18,5 con respecto a la expresión en las líneas de células endocrinas α TC y β TC e islotes adultos. Los componentes de las células endocrinas de islotes se indican subrayados; los autoantígenos conocidos se indican en negrita.

enriquecido >5 veces con α TC	enriquecido >5 veces en β TC	No enriquecido en α TC ni en β TC	No expresado en α TC ni en β TC
1110005D19Rik	1100001E04Rik	7-Sep 9030612M13Rik	1810044E12Rik
1700040L02Rik	1110035L05Rik	9830160H19Rik	2310010116Rik
2310014L03Rik	1700041 C02Rik	A430107J06Rik Abcc8	2310067E08Rik
2810431N21Rik	1810018P12Rik	Aco1 Actr3 ank Aplp1	4731413G05Rik
2900052J15Rik	2010011I20Rik	Atp1a1 AW011752	5133401 E04Rik
6430527G18Rik	2310007H09Rik	AW011752 Banf1	5730453H04Rik
6430527G18Rik	2610016M12Rik	BC016198 BC042620	5930418K15Rik
7420452D20Rik	2700049B16Rik	BC061928 C130083N04Rik	6430401 D08 6720464I07Rik
9430022M17Rik	2900001G08Rik	C230068E13	8430421 H08Rik
9430023B20	3100002J23Rik	C820002P14Rik Calm1	9030425P06Rik AA589382
9530058B02Rik	3110018A08Rik	Capza2 Ccnb1 Ccnh Ccni	Ace2 Acvr2 Apoa1 Argef1
A630013F22Rik <i>Apoa2</i> <i>Arx</i>	3110050F08Rik	Cda08-pendiente Cdc5l	Asah2 B230312I18Rik
B230206N24Rik	5830437M04Rik	Cdkn2d Cgef2-pendiente	BC027756 BC054438 Braf
B230309E09Rik	5930418K15Rik	Chga <u>Chgb</u> Chic1 Clcn3	C030034I22Rik
B430319H24Rik <i>Btg2</i>	9330186A19Rik	Cot1 <u>Cpe</u> Csnk1d	C130047D21Rik
Cald1 Car2 CGI-141-pendiente	9830147J24Rik	D16lum22e D7Ertd743e	C130099L13Rik C1qb C3
Copg2as2	A530058N18Rik	D9Wsu20e Ddx9 Donson	C430010P07Rik Cd9w2
D6Ertd253e <i>Ednra</i> <i>Eno2</i>	A930001M12Rik	Dscr2 Emb Emb Foxa2	Ceacam2 Cfh Cpne3 Ctss
Epb7.2 <i>Fbp2</i> Fev-pendiente	A930009L07Rik Adcy7	Gna11 Gng5 H2-D1	Dnajc13 E130113K08Rik
Foxf2 Galnt7 <u>Gcq</u> <i>Gfra1</i>	Adra2a Al173274	Hdac2 Hmgcr Hmgn3	Ecm1 Enah Fabp1 Fabp4
Glcci1 Gpr30 <i>Gstt2</i> <u>Hes1</u>	Al315068	Hmgn3 Hnrpab Hnrpu	Fbxl12 Fcgr2b Fgl2 Flt1
Hs3st1 Ier3 Irx2 Itih2 Kap	AI987662 Ang Asc-pendiente	Hspa5 lerepo4-pendiente	<u>Foxa3</u> <u>Frzb</u> Gbp2 Gca
Atp2a3 AW125421	<u>Isl1</u>	Khdrbs3 Kif11 Kif5b	<u>Ghrl</u> H2-Ab1 Hba-a1
LOC224093 Mtp Pde3a	B630019K06Rik	LOC218490 LOC226144	Homez Hpvc2 Il6ra <u>Insrr</u>
Pde3a <u>Pou3f4</u> <i>Rbp4</i> Rgs4	B930068K11Rik	LOC231887 LOC240396	Jarid1c Klf9 LOC214424
BC026600	BC052055 Bicc1 Bok Cat	Map3k7 Matr3 Matr3	LOC56628 Lyzs Lyzs Lyzs
Sbsn-pendiente Sdc4 Sdc4	Cav2 Cd44 Crip Crp	MGC65558 MGC6694	Mapk14 MGC25863 Mglap
Tle6 Trf Ttr	D930029E11Rik Dach2	Mrps16 Mtch2-pendiente	Mta3 Narg2 Ndel1 Nedd9
Dcx	Dcep1 Dpp4 Dscr11 Ebf3	Ndr3 <u>Neurod1</u> <u>Nkx2-2</u>	Nov Pah Pkhd1 <u>Ppy</u> <u>Pyy</u>
4930459B04Rik <i>Ttyh1</i>	Eif2s3y Elovl2 F13a	Np95 Paxip1 <u>Pcsk1n</u>	Rbp7 Ret Rgpr-pendiente
Ttyh1 <u>Vegfc</u> Vldr Zdhhc14	Frabin-pendiente <u>G6pc</u> -rs	Pcsk2 Pctk1 Pfdn1 Pitpn	S100a6 S100a8 Scp2
Zfp52.	Gch Gck Gipr Glp1r		

	Gna13 Gpr27 H2-D1 Hlxb9 HpcA Hspa12a-pendiente <u>Iapp</u> <u>Ins1</u> <u>Ins2</u> <u>Insm1</u> <u>lpf1</u> Iqgap1 Krt2-8 Lgals2 Lhx2 Lmwds20-pendiente LOC194126 LOC215866 LOC328644 Maob Mbc2 MGC47419 Myo7b Necab2-pendiente Nmi <u>Nnat</u> Npy Nudt7 Papss2 Papss2 <u>Pclo</u> Ppp1r1a Prcad-pendiente Prkcb Pvrl3 <u>Ramp1</u> Rasd1 Rasgrf1 Sepp1 Slc12a7 <u>Slc2a2</u> Slitl2 Stx3 Svil Syt4 Tec Tnnt1 Ubap1 <u>Wbscr14.</u>	Pmp <u>Psk1</u> -pendiente Psmb3 <u>Ptpn</u> Ptig1 Rab6 Rad21 Ramp2 Ranbp1 Rbpms Rcn2 Refbp2 Resp18 Risc-pendiente Rnpc2 <u>Scg2</u> Sdfr1 Sfrs3 <u>Sgne1</u> Smc4l1 Spi1-1 Sqle Ssb <u>Syt13</u> <u>Syt7</u> <u>Syt7</u> Tmpo Tomm20-pendiente Txnrd1 Ube1c Ubl3 Ubqln2 Vdu1-pendiente Wwp4-pendiente Xlr3a Ywhab Ywhaz Yy1 Zfp364.	Siat8c <u>Sst</u> Sycp3 Tacstd1 Timp3 Tm4sf3 Tnfrsf11b Tor3a Tpra40-pendiente Trim44 Tsll2-pendiente Usp15 Usp47 Utx <u>Vcam1</u> Wasip Zfp219 Zfp36l1 Zfp40 Zfpn1a2.
--	--	--	---

La Tabla 2 también muestra la distribución de autoantígenos DT1 conocidos, destacados en negrita. Este análisis bioinformático relativamente sencillo mostró la insulina 1 y 2, IGRP (G6Pc-rs), IAPP e IA-2 (PTPRN) en sus localizaciones celulares esperadas pero no GAD65. Sin embargo el último no se detecta en islotes de ratón por la mayoría de los investigadores, incluyendo los inventores, incluso aunque es abundante en islotes humanos (71). El análisis anterior destaca el hecho de que muchos autoantígenos muestran especificidad de tipo celular. Sin embargo ya que de por sí no es suficiente para definir un candidato, y por tanto el enfoque bioinformático se ha refinado para tener en cuenta diversas características que se piensa que son atributos de candidatos autoantigénicos y al mismo tiempo no excluye candidatos basados en una decisión presente/ausente. El modelo en esencia tiene en cuenta las siguientes características:

1. Los autoantígenos muestran especificidad con la célula diana, aunque esto no es necesariamente absoluto.
2. La mayoría de los autoantígenos se expresan a niveles de moderados a altos en la célula diana.
3. Los autoantígenos de DT1 parecen estar físicamente asociados con elementos de la ruta secretora regulada.
4. Muchas de las dianas de autoinmunidad mediada por células parecen estar asociadas a membrana.
5. La mayoría también se expresa en células que expresan antígeno periférico del timo.
6. Varios muestran modelos específicos de tejido de corte y empalme alternativo.

Las características 1-4 pueden evaluarse basándose en la intersección de conjuntos de datos de micromatriz y anotación de los genes componentes. Se piensa que es posible obtener un "índice autoantigénico" basándose en dichos datos, aunque la cantidad de énfasis para poner en características biológicas celulares y biológicas moleculares, estructurales particulares como una contribución a la antigenicidad aún se está determinando, como lo está la contribución relativa a respuestas humorales en comparación con las mediadas por célula. Para abordar estas cuestiones, los inventores compilaron 2 conjuntos de genes, uno de ratón y otro de ser humano, basándose en la abundancia y especificidad de expresión con respecto al páncreas endocrino (Tabla 3); los datos de ratón derivaron de los datos de la Tabla 2, los datos de seres humanos sobre los datos de expresión del Gen Atlas Novartis de 79 tejidos humanos (72). Se realizaron análisis en GeneSpring y GeneSpeed, el último una base de datos de dominio de proteínas desarrollada en el Centro Barbara Davis en Denver, Colorado por Jan Jensen y colaboradores.

Tabla 3

A: Transcritos de células β de ratón. Se seleccionaron 308 transcritos basados en su ausencia en páncreas de ratones nulos Ngn3, su presencia en islotes adultos y su presencia en líneas celulares β-TC. La base de datos de expresión EST Unigene se interrogó con cada uno de estos genes para determinar la frecuencia con la cual cada gen se transcribió en 38 tejidos de ratón diferentes, incluyendo páncreas (pero no los islotes). La frecuencia clonal EST por millón se tabuló junto con el % de transcritos observados en páncreas en comparación con el total en todos los tejidos (especificidad). El producto de la abundancia y especificidad se usó para clasificar los datos.

Los transcritos que codifican autoantígenos de diabetes conocidos se destacan.

B: Transcritos humanos. Se consultó inicialmente la matriz de oligonucleótidos diseñada por Novartis que representa 71 tejidos humanos diferentes para determinar qué genes en el conjunto de datos de islotes pancreáticos mostraba una señal significativamente diferente de la mediana del valor de todos los otros tejidos (límite ANOVA <0,0002). El subconjunto de estos transcritos que presentaron una señal 5 veces mayor que la de la mediana de todos los tejidos se filtró para retirar los transcritos que mostraban fuerzas de señal baja (<200) y aquellas que se expresaban a mayores niveles en páncreas frente a islotes. Los 140 genes que cumplieron estos criterios se usaron después para interrogar la base de datos de expresión EST Unigene para determinar la frecuencia con la cual cada gen se transcribía en 52 tejidos humanos diferentes incluyendo páncreas. La frecuencia clonal de EST por millón para páncreas (abundancia) se tabuló junto con el % de transcritos en páncreas con respecto a todos los tejidos (especificidad). Los datos se clasificaron sobre el índice de Abu*Spec. Los transcritos que codifican autoantígenos de diabetes conocidos se destacan.

Genes de ratón						Genes humanos					
Nombre	Unigene	Clasificación	Abundancia	Especificidad	Abu*Spec	Nombre	Unigene	Clasificación	Abundancia	Especificidad	Abu*Spec
Ins2	Mm.4946	1	8880,0	99,5	8834,2	INS	Hs.89832	1	15491,0	99,9	15470,0
Ins1	Mm.46269	2	8224,0	99,6	8190,1	SGNE1	Hs.156540	2	1884,0	50,7	955,7
lapp	Mm.415	3	4458,0	98,7	4400,7	IAPP	Hs.46835	3	1670,0	51,2	854,7
G6pc-rs	Mm. 140768	4	282,0	94,6	266,9	SLC30A8	Hs.532270	4	830,0	81,7	678,1
SLC30AS	Mm.208831	5	151,0	100,0	151,0	PCSK1N	Hs.522640	5	1026,0	42,9	439,9
Pcsk2	Mm.294493	6	765,0	18,2	138,9	GNAS	Hs.125898	6	4600,0	9,4	434,2
2900001G08	FMn. 102196	7	173,0	64,8	112,1	GA065	Hs.231829	7	356,0	75,9	270,2
ER01LB	Mm.326609	9	231,0	29,2	67,5	TM4SF4	Hs.133527	8	565,0	43,3	244,4
EST	Mm.25089	10	71,0	63,4	45,0	G6PC2	Hs.283963	9	260,0	84,7	220,2
TM4SF4	Mm.26618	11	127,0	34,1	43,4	CPE	Hs.75360	10	675,0	29,6	199,7
Ppp1i9a	Mm.332901	12	273,0	15,7	42,8	CEL	Hs.533258	11	428,0	39,8	170,4
PCSK1	Mm.1333	13	98,0	36,6	35,8	NKX2.2	Hs.516922	12	187,0	90,3	168,9
PTPrN	Mm.2902	14	346,0	10,2	35,2	ER01LB	Hs.558519	13	424,0	29,6	125,4
GIMAS	Mm.125770	15	729,0	3,9	28,5	CHGB	Hs.516874	14	784,0	14,8	116,1
EST	Mm.380993	16	160,0	17,6	28,2	PCKS2	Hs.315186	15	433,0	23,9	103,4
Iqgap1	Mm.207619	17	328,0	7,5	24,5	IPF1	Hs.32938	16	91,0	100,0	91,0
Sup1t6h	Mm.286066	18	200,0	12,2	24,3	INSM1	Hs.89584	17	187,0	46,2	86,3
EST	Mm. 156365	19	54,0	34,2	18,5	PAX6	Hs.591993	18	292,0	28,9	84,3
GNG12	Mm.234342	20	267,0	6,3	16,8	SCGN	Hs.116428	19	187,0	42,7	79,8
Gipr	Mm.333633	21	54,0	29,7	16,0	PCSK1	Hs.78977	20	214,0	28,5	61,0
Rasgrfl	Mm.44561	23	136,0	10,6	14,4	APLP1	Hs.74565	21	328,0	15,5	50,7
Tmem54	Mm.25295	24	100,0	13,6	13,6	SCG3	Hs.232618	22	177,0	23,4	41,5
SGNE	Mm.4836	25	237,0	5,3	12,5	CFTR	Hs.489786	23	200,0	20,S	40,9
PAPSS2	Mm.203916	26	115,0	9,5	10,9	SCG2	Hs.516726	24	282,0	14,0	39,6
PTPrN2	Mm.206054	27	145,0	7,3	10,6	KRT17	Hs.2785	25	2276,0	1,7	38,0
Pcsk1N	Mm.4881	47	109,0	3,7	4,0	PTPrN	Hs.89655	26	150,0	18,1	27,2
ICA69	Mm.275885	48	72,0	6,1	3,7	PTPrN2	Hs.490789	44	187,0	6,3	11,7
Dmpk	Mm.6529	99	9,0	0,8	0,1	ICA69	Hs.487561	58	86,0	5,7	4,9
						GAD67	Hs.420036	96	4,0	0,5	0,0

15 En ambos casos los autoantígenos de diabetes conocidos aparecen en la parte superior de la lista e incluso las dianas autoinmunes humorales minoritarias tales como ICA69 y GAD67 están en los 100 candidatos superiores. Los transcritos de ambos listados se solaparon considerablemente y su abundancia relativa y especificidad tisular fue similar con la excepción de GAD65 que se expresa mal en islotes de ratón en comparación con los de seres humanos. Muchas de las proteínas de las 100 superiores son proteínas granulares secretoras o proteínas de membrana asociadas con la ruta secretora determinado por examen de funciones de ontología génica (GO) en la base de datos SWISS PROT, Prosise y EPCONdb.

20 Para abordar la cuestión de si estas listas génicas pueden realmente predecir dianas autoantigénicas, los inventores desarrollaron un ensayo de inmunoprecipitación para Slc30a8 (conocido ahora como ZnT8), un transportador catiónico transmembrana que aparece alto tanto en la lista de genes de ser humano como de ratón como un transcríto de abundancia moderada pero con alta especificidad tisular. Se desarrolló un ensayo de radioinmunoprecipitación usando traducción *in vitro* de la secuencia clonada y sueros humanos de 44 sujetos de recién aparición antes de la terapia con insulina y 40 controles de la misma edad y mismo HLA (Figura 1). Específicamente, Slc30a8 se amplificó de ADNC de islete humano y se clonó en el vector topo direccional pCDNA3, se verificó su secuencia y se usó como un molde (0,5 µg) en una reacción de traducción *in vitro* de lisado reticulocítico con 5 µCi y ³⁵S metionina. Las muestras de suero humano (5 µl) se incubaron durante una noche a 4 °C con 20.000 dpm del producto de traducción en solución salina tamponada con Tris 50 µl que contenía NP40 al 0,1 %. Se añadió Proteína A Inmovilizada a cada incubación y el aislado por radiactividad unido con inmunoglobulina por filtración y se determinó por recuento de centelleo.

35 Nueve de las muestras de suero DT1 mostraron unión significativa por encima de los niveles observados con el suero control (ensayo de 2 colas no paramétrico de Mann Whitney) alcanzando como mucho el 50 % del ligando radiactivo presente en el ensayo. Los autoanticuerpos estaban presentes tanto en pacientes de recién aparición (<8 años de edad) como más mayores (<8 años). De los 9 pacientes positivos, 6 también se ensayaron como positivos para los anticuerpos de insulina, 5 para GAD y 6 para IA-2. Slc30a8 parecería ser un marcador de enfermedad independiente.

40 El desarrollo posterior de ensayos serológicos diagnósticos y ensayos para autoinmunidad mediada por células

requiere la producción de antígenos que son al menos funcionalmente puros, plegados en una conformación nativa y sin impurezas mitogénicas. Esta no es una cuestión trivial, especialmente para las proteínas transmembrana como Slc30a8 e IGRP que tienen tendencia a ser tóxicas para células bacterianas y eucariotas cuando se sobreexpresan.

- 5 En el caso de IGRP, los inventores han podido expresar previamente altos niveles de antígeno en una forma nativa transfectando establemente células S2 de *Drosophila* usando una construcción activada por un promotor de metalotioneína regulado. Las fracciones de membrana en bruto (FMC) de dichas células se han ensayado con un clon de hibridoma de células T reactivo a IGRP que se generó por fusión de células de ganglios linfáticos de drenaje de ratones NOD inmunizados con IGRP con líneas de linfoma BWZ36 que expresan establemente LacZ bajo el control del promotor de IL-2 (73).

10 Por ejemplo, en la imagen digitalizada mostrada en la Figura 2A, las células S2 se transfecaron de manera estable con la construcción mIGRP V5 His y la expresión se indujo con Cu 0,5 nM y la fracción de membrana celular (FMC) transferida con anticuerpo anti V5. La proteína se extrajo eficazmente con TX-100, unido a la columna de afinidad de quelato metálico y se eluyó con imidazol en condiciones no desnaturalizantes. La Figura 2B es un gráfico que muestra un ensayo de respuesta para los hibridomas de células T IGRP-FMC (clon 1-76-54). Los hibridomas de células T (2×10^5 células/pocillo) se incubaron durante una noche con esplenocitos NOD irradiados como APC (1 x 10^6 células/pocillo) y antígeno (IGRP-FMC o S2-FMC, 10 µg proteína/pocillo). La actividad β-galactosidasa se ensayó espectrofotométricamente. Las Figuras 2A-3B demuestran que la producción de IGRP está estrechamente regulada por el promotor de metalotioneína (Fig. 2A) y en que las fracciones de membrana en bruto pueden procesarse por las APC de mamífero para inducir una respuesta específica de IGRP del clon de hibridoma de células T reactivo a IGRP (Fig. 2B) medido espectrofotométricamente con clorofenol rojo-β-galactósido como sustrato. La combinación de la expresión de células de insecto de supuesto antígeno con proliferación de células T o ensayos de activación de hibridoma proporciona un conjunto genérico pero robusto de protocolos operativos convencionales que podrían adaptarse a diversas proteínas, incluyendo constituyentes solubles y de membrana y aquellos que requieren glucosilación y otras modificaciones posttraduccionales.

Ejemplo 2

30 El siguiente ejemplo describe ensayos para identificar dianas adicionales de autoinmunidad mediada por células y humorales evaluando adicionalmente la lista corta de posibles candidatos de la Tabla 3 (véase Ejemplo 1). Inicialmente, para candidatos no familiares y moléculas representadas solo como EST, se obtuvieron clones de longitud completa y se realizaron análisis de hibridación *in situ* en tejido pancreático de ser humano y ratón para verificar su expresión en las células β.

Exploración de antígenos candidatos por análisis serológico en sujetos humanos.

40 Estos ensayos se realizan mejor en sujetos humanos ya que posiblemente un espectro más amplio de respuestas autoinmunitarias debido a la diversidad genética y complejidad de los genes de respuesta inmunitaria. También pueden explorarse grandes cantidades de muestras al día usando procedimientos semiautomatizados en un formato de 96 pocillos a un coste bajo por muestra. El Centro Barbara Davis tiene decenas de miles de muestras archivadas que están bien explicadas y analizadas con respecto al haplotipo HLA, autorreactividad a moléculas asociadas con DT1 (insulina, GAD65, IA2, fogrina), enfermedad celiaca (transglutaminasa IgA) y enfermedad poliendocrina incluyendo corteza adrenal afectada (21β-hidroxilasa para Addison (74)) y tiroides (receptor TSH (75)). Se dispone de más de 20.000 sueros de pacientes de nueva aparición, junto con menores números de muestras de gemelos idénticos discordantes para muestras DT1 y en serie obtenidas de parientes de primer grado de pacientes diabéticos que abarcan estadios de enfermedad de negatividad de anticuerpos, hasta positividad de anticuerpos sencilla y múltiple y aparición de la enfermedad.

50 50 Se desarrollaron dos tipos de ensayo inicialmente basándose en radioinmunoprecipitación y detección de fluorescencia resuelta en tiempo (TRF) respectivamente. Ambos ensayos requieren la clonación y expresión del antígeno candidato, y los inventores han tomado una estrategia genérica que comienza con el ARNm retrotranscrita o un plásmido MGC certificado que servirá como moldes de PCR usando cebadores diseñados para insertar la secuencia en un vector de entrada GATEWAY de Invitrogen. A partir del vector de entrada la secuencia puede dirigirse a la traducción *in vitro*, generación de proteínas recombinantes bacterianas, producción de adenovirus o baculovirus a través de la recombinación de una sola etapa.

60 Para el ensayo de radioprecipitación, el ADNc clonado bajo el promotor del CMV se usará como molde (0,5 µg) en una reacción de transcripción/traducción acoplada (kit TNT; Promega) usando un lisado reticulocítico y 5 µCi de ^{35}S metionina. Las muestras de suero (5 µl) en placas de 96 pocillos se incubaron durante una noche a 4 °C con 20.000 dpm del producto de traducción en 50 µl de solución salina tamponada con Tris que contenía NP40 al 0,1 %. Despues se añadió proteína A inmovilizada a cada incubación para capturar la radiactividad unida a inmunoglobulina que se recubre después por filtración y radiactividad determinada por recuento de centelleo. Los sueros de referencia positivos y negativos se procesan en cada ensayo para conseguir la estandarización y normalización.

Para el ensayo TRF, el ADNc se expresa como una construcción marcada con histidina en células de *E. coli* o insecto según sea apropiado y se purifica por cromatografía de quelatos metálicos. Las placas de 96 pocillos se cubren con la proteína purificada (1-10 µg/ml), se bloquean y después se incuban con suero durante una noche a 4 °C en 50 µl de solución salina tamponada con Tris que contenía NP40 al 0,1 %. La unión de la inmunoglobulina con la placa se determina usando anti IgG humana de ratón conjugado con Europio (DELFIA) y medición de fluorescencia resuelta en tiempo a un pH ácido (contador multicanal Victor 2). En ambos tipos de ensayos, los controles se realizarán con preabsorción de los anticuerpos con antígeno recombinante para ensayar la especificidad y descartar artefactos de anticuerpo heterófilos. En el caso de antígenos asociados a membrana puede resultar ser necesario trabajar con construcciones específicas de dominio en lugar de con moléculas de longitud completa sin embargo esto puede realizarse fácilmente diseñando cebadores para amplificar dominios específicos y clonar de la misma manera a la descrita anteriormente.

El objetivo inicial será explorar un banco de 190 sueros de DT1 de nueva aparición y 190 controles equivalentes para establecer la especificidad y sensibilidad de cada ensayo usando un análisis de curva operadora receptora para determinar límites aceptables y ensayo no paramétrico Mann Whitney para establecer significación estadística (programa informático Prism; Graphpad Inc.). Un resultado positivo con los sueros de diabéticos se seguirá por optimización posterior del procedimiento del ensayo para minimizar el fondo y maximizar la señal/fondo. Un resultado verdadero negativo (fondo bajo y señal/interferencia de 1) puede seguirse después modificando el ensayo, por ejemplo introduciendo microsomas pancréaticos en el ensayo de traducción *in vitro*. Los ensayos con baja especificidad de enfermedad pueden algunas veces mejorarse mediante esfuerzos concertados para reducir el ruido en el ensayo usando construcciones sin dominios hidrófobos, diferentes agentes bloqueantes, diferentes procedimientos de captura de inmunoglobulina y emparejando sueros de ensayo con muestras preabsorbidas con antígeno recombinante. La cantidad de esfuerzo dirigida a resolver problemas dependerá obviamente de la naturaleza del problema y de la indicación de si se sospecha la autorreactividad específica de enfermedad. Ensayos prometedores se seguirán por la aplicación con otras muestras clínicas disponibles para aclarar las cuestiones de cuándo en la historia natural de la enfermedad se produce la autorreactividad, el solapamiento de autorreactividad con otros autoantígenos y si existe una asociación con la edad o estado HLA de los pacientes. Diversas publicaciones del laboratorio de los inventores y del Centro de Barbara Davis sirven como moldes para dichos estudios (76; 77).

Exploración de ratones transgénicos HLA-DR3, -DR4 y -DQ8 para respuestas inmunitarias mediadas por células contra los antígenos candidatos.

Los datos previos de los inventores muestran que ratones HLA-DQ8⁺ I-A^{B/0} en un fondo B10.M pueden generar respuestas de recuerdo de células T CD4⁺ contra péptidos epitópicos de fgrina 2 y 7 y que los mismos péptidos están dirigidos por células T periféricas en pacientes de nueva aparición humanos muchos de los cuales tienen el haplotipo DR4/DQ8 (78). Estos estudios previos apoyan la suposición de que el HLA-DQ8 humano tiene especificidad de unión similar a la de I-A^{G7} de ratón, y que la molécula DQ8 podría presentar antígeno en el contexto de moléculas coestimuladoras y accesorias de ratón o ser humano. Afirman la utilidad de los modelos transgénicos de ratón como un medio para identificar epitopos que son relevantes en enfermedades en seres humanos incluso cuando los transgenes HLA ya no se llevan en un fondo susceptible estrictamente diabético. Para evaluar el espectro completo de epitopos de células T de cualquier antígeno candidato que pueda estar presente por loci de susceptibilidad a MHC en seres humanos diabéticos de tipo 1A, las respuestas de recuerdo de células T después de inmunización con la proteína recombinante humana se analizan usando ratones transgénicos HLA-DQ8, -DR3 (DRB1*0301) y -DR4 (DRB1*0401) que representan loci de susceptibilidad a diabetes conocidos y HLA-DR2 (DRB1*1502) como un control para una molécula "protectora" de clase II sin asociación con diabetes.

Animales: se generaron diversas cepas de ratones transgénicos de HLA-DR y DQ para evaluar la función de estas moléculas en la forma de la respuesta inmunitaria en enfermedades tales como DT1, encefalitis autoinmunitaria experimental y lupus eritematoso sistémico (79; 80). Los inventores han obtenido ratones transgénicos HLA-DQ8⁺ I-A^{B/0}, -DR2, -DR3 y -DR4 del Dr. Chella David, Departamento de Inmunología, Clínica Mayo, Rochester, MN y establecieron colonias de estos en el centro de los inventores. Una segunda línea HLA-DR4 con un CD4 humano se obtuvo recientemente de la Dr. Greta Sonderstrup, Universidad de Stanford y los números se están expandiendo actualmente. Los ratones HLA-DQ8 (DQA1*0301/ DQB1*0302) se produjeron con una construcción genómica en un fondo I-A^{B/0} I-Ea^{0/0} y por tanto producen HLA-DQ8 como la única molécula de clase II. Una construcción genómica - DR2 (DRB1*1502) y de ADNc de DR4 (DRB1*0401) y DR3 (DRB1*0301) se emparejaron con un transgén I-Ea de ratón o DRa humano. Todos los animales transgénicos. Todos los animales transgénicos se genotipificaron por PCR de ADN obtenido de la cola para la expresión de MHC y análisis FACS realizados sobre CMSR y esplenocitos para establecer los niveles de expresión de transgenes humanos y controlar la expresión de los productos génicos de MHC de ratón.

Células presentadoras de antígeno (APC): esplenocitos de ratón singénicos irradiados (20-35 Gy) o CD derivadas de médula ósea se usarán para estimulación *in vitro* de células CD4⁺ por coincubación en presencia de antígeno de proteína (1-100 µg/ml) o péptidos (0,1-10 µg/ml). Cuando se usan, las CD se prepararán de la médula de tibias y

fémures de ratones macho de 8-12 semanas después de lavado con una aguja de jeringa de tamaño 25. Los desechos y grandes agregados celulares se eliminan por filtración (malla de 70 µm), los eritrocitos se lisan con NH₄Cl y las células se resuspenden en RPMI 1640 que contienen FBS sin endotoxina termoinactivado al 10 % y complementado con antibióticos, piruvato (1 µM), β-mercaptopetanol (50 µM) y GM-CSF 10 ng/ml. Las células no

5 adherentes se eliminaron del cultivo los días 2 y 4 reemplazando con medios recientes y las células poco adherentes se recuperaron el día 6 (las CD predominantemente inmaduras con algunos monocitos y granulocitos contaminantes). En esta unión las células se expondrán durante 24-48 horas a antígeno recombinante junto con lipopolisacárido bacteriano (LPS) 0,1 µg/ml para inducir la "maduración" y regulación positiva de moléculas de MHC de clase II.

10 *Líneas e hibridomas de células T:* las líneas y clones de células T se generarán a partir de los ratones transgénicos por la estrategia que se usó previamente (78) que se basa en la inmunización (antígeno recombinante 5-100 µg inyectado por vía subcutánea en la base de la cola en 50 µl de CFA) para inducir respuestas específicas de antígeno. Las células T se recogerán de los ganglios linfáticos periaórticos e inguinales 8-10 días después de la 15 inmunización y se analizarán con respecto a respuestas de recuerdo CD4⁺ contra el antígeno preferentemente producido en un sistema de vector alternativo (es decir se inmunizan con antígeno marcado con His de células S2; recuerdo con híbrido GST bacteriano). Posteriormente las células específicas de antígeno se usarán para generar hibridomas de células T. Las células T se someterán a una sola ronda de estimulación *in vitro* antes de la fusión mediada por polietilenglicol con la línea de timoma BWZ36 que expresa de manera estable LacZ bajo el control de 20 elementos NFAT del promotor de IL-2 (73). Las líneas resistentes a HAT se propagarán en RPMI/FBS, clonadas por dilución limitante, y se ensayan por cocultivo de 1 x 10⁵ células de hibridoma con 1 x 10⁶ esplenocitos singénicos en RPMI/FBS y antígeno. Después de 16-24 h la β-galactosidasa inducida se medirá usando el sustrato colorimétrico soluble rojo de clorofenol-β-galactósido (véase la Figura 1) o en las células de hibridoma fijas individuales usando X-Gal. Para confirmar la restricción de MHC, los hibridomas también se someterán a ensayo usando APC alternativas 25 incluyendo esplenocitos de ratones no transgénicos del mismo fondo genético, y un panel de líneas celulares linfoblastoides B transformadas con VEB que se establecen normalmente de DT1 y donantes de órganos control; véase (78). Para garantizar la clonalidad y evaluar la diversidad clonal, el uso de TCR se determinará secuenciando ADNc clonado preparado a partir de ARN total por PCR inversa (81).

30 La experiencia previa de los inventores que investigan respuestas de células T al dominio citoplasmático de fagrina en animales transgénicos HLA-DQ8⁺ y DR4⁺ indican que, suponiendo inmunogenicidad, las respuestas contra otros antígenos deben obtenerse en estos animales y que probablemente serán informativas. I-A^{q7} y -DQ8 son 35 funcionalmente muy similares en términos de su capacidad para presentar péptidos relacionados, incluso aunque las APC que portan estas moléculas no presentan en cruzado a células T limitadas a la molécula ortóloga. Dado que la producción de anticuerpos cambiado a clase de alta afinidad es un proceso dependiente de T, se prevé que las 40 respuestas de recuerdo se detectarán a partir de animales inmunizados con antígenos que previamente se ha mostrado que suscitan autoanticuerpos en el experimento descrito anteriormente. Sin embargo, lo inverso no es necesariamente cierto; los antígenos que no muestran una respuesta humoral pueden aún ser dianas de inmunidad mediada por células. El transgén HLA-DR2 se incluye en el presente estudio como una molécula de clase II que no 45 está asociada con la susceptibilidad diabética y que puede estar relacionado con diferentes epítopos que no están relacionados con la enfermedad. La experiencia previa de los inventores sugiere que más probablemente se obtiene una mayor diversidad de RTC usando hibridomas en lugar de clones de células T y por lo tanto el enfoque inicial será generar dichos reactivos.

50 A diferencia del ratón NOD, sujetos diabéticos humanos expresan múltiples moléculas del MHC de clase II y una zona posible de estudio futuro es investigar diversos alelos susceptibles o protectores de diabetes en animales doblemente transgénicos. Animales HLA-DR3/-DQ8, por ejemplo, desarrollan una insulitis más grave (pero no diabetes) y muestran respuestas espontáneas potenciadas contra GAD65 en comparación con los animales parentales (82; 83). Sin quedar ligado a la teoría, los inventores piensan que también podrían mostrar sensibilidad aumentada contra un autoantígeno candidato. De manera similar los efectos de coexpresar HLA-DR3 y -DR4 o HLA-DR2 y -DQ8 podrían examinarse.

Ejemplo 3

55 El siguiente ejemplo describe experimentos adicionales relacionados con la identificación de ZnT8 como un nuevo marcador y diana de autoinmunidad diabética.

El concepto de que el ADNc que codifica ZnT8 podría ser de interés como un marcador de autoinmunidad diabética surge de un análisis bioinformático de conjuntos de datos de micromatriz de un ratón genosuprimido (nulo Ngn3) y la 60 comparación con modelos de expresión tisular en otros tejidos (Ejemplo 1). Inicialmente, el marcador se identificó como Unigene Mm.208831 correspondiente a la Riken EST C820002P14, y después se reconoció que correspondía a ZnT8.

65 Los inventores produjeron una ZnT8 de longitud completa y ensayaron la proteína en un ensayo de radioinmunoprecipitación con suero de diabéticos de nueva aparición en una serie de experimentos. Los datos

iniciales indican que el 10 % de los pacientes mostraron reactividad, indicando que ZnT8 podría ser un nuevo autoantígeno útil en ensayos de diagnóstico para la diabetes de tipo I.

Los inventores diseñaron después y produjeron un fragmento C terminal de ZnT8, correspondiente a los aproximadamente 102 aminoácidos finales de la molécula de longitud completa. El ensayo de este fragmento en ensayos se resume más adelante.

El suero de 144 pacientes DT1 de nueva aparición (edades entre 1 y 55 años de edad; edad promedio 11,9 años) se ensayó usando el fragmento ZnT8 y 45 % fueron positivos en un ensayo de radioinmunoprecipitación frente a <1 % en una edad y población de control HLA equiparada. La estratificación por edades mostró que los anticuerpos presentaron una tendencia a ser más altos en individuos mayores con un pico de 70 % en el grupo con aparición de diabetes a los 12-15 años. El perfil de edad fue similar al de los otros autoantígenos diabéticos, GAD65 e IA2, pero aparece más tarde que para los anticuerpos de insulina. La autorreactividad contra el nuevo antígeno no mostró correlación con niveles de IAA, GAD e IA2 de autorreactividad y por tanto se consideró como un marcador independiente.

Se analizaron muestras de 9 individuos a los que se realizó un seguimiento desde <1 año de vida a la aparición de diabetes clínica. Estos procedían de la cohorte de hermanos del estudio DAISY en el Centro de Barbara Davis. 8 de estos individuos eran seropositivos durante la evolución de la prediabetes. La autorreactividad tendió a aparecer más tarde durante la prediabetes y normalmente seguido por la aparición de autoanticuerpos de GAD e insulina. El tiempo de aparición en algunos casos precedió o siguió a la autorreactividad de IA2. En uno de los sujetos, el anti-ZnT8 fue el único anticuerpo detectado antes de la aparición de la enfermedad, subrayando la importancia del descubrimiento de este nuevo autoantígeno.

Se analizaron 8 nuevos individuos de nueva aparición que eran negativos para anticuerpos de insulina GAD o IA2. De este grupo, 2 fueron positivos para el nuevo antígeno, reforzando de nuevo el concepto de que esto tiene un valor predictivo independientemente de los marcadores existentes.

Más específicamente, referente a la Figura 5, esta figura muestra un ensayo patrón para sondas C term de ZnT8. La curva representa la media ± DT de una serie de dilución ensayada por duplicado en 7 experimentos distintos. Los experimentos se realizaron durante un periodo de 3 meses y se usaron diferentes reacciones de traducción *in vitro*. Las sondas marcadas con ³⁵S traducidas *in vitro* (20000 rpm) se incubaron durante una noche con 5 µl de suero en 50 µl de PBS pH 7,4 que contenía Tween 20 al 0,15 %, BSA al 1 % y azida sódica al 0,01 % antes de la adición de 20 µl de un 50 % en volumen de una suspensión de perlas de agarosa de Proteína A. Después de 45 minutos las perlas se recuperaron por filtración, se lavaron 4 veces después se secaron antes de la adición de 30 µl de fluido de centelleo y se realizó el recuento de centelleo líquido. Se desarrollaron ensayos comparables para sondas ORF ZnT8 y N-term. Sondas positivas: conjunto de 9 sueros diabéticos de nueva aparición contra dilución de duplicación en sueros de control agrupados; Muestras control: grupo de muestras de 9 muestras de edad, género y HLA iguales para hermanos de diabéticos; Unión no específica: sin adición de suero.

La Fig. 6 muestra los resultados de un estudio DASP oculto con diferentes construcciones de ZnT8. Las construcciones marcadas con ³⁵S traducidas *in vitro* (20000 rpm) se incubaron durante una noche con 5 µl de suero en 50 µl de PBS que contenía Tween 20 al 0,15 %, BSA al 1 % y azida sódica al 0,01 % antes de la adición de 20 µl de un volumen del 50 % de suspensión de perlas de agarosa Proteína A. Después de 45 minutos las perlas se recuperaron por filtración, se lavaron 4 veces y después se secaron antes de la adición de 30 µl de líquido de centelleo y recuento de centelleo líquido. La radiactividad inmunoprecipitada se expresó como la fracción relativa en comparación con un patrón preparado de los sueros agrupados y un panel de 16 sueros control individuales como se indica: índice de antigenicidad (ensayo rpm menos la media rpm control)/(patrón rpm menos control medio). Los ensayos se realizaron por triplicado. DASP proporcionó 100 muestras de referencia como controles y 50 muestras diabéticas de nueva aparición coincidentes. El límite del ensayo se definió como el índice correspondiente con el control medio +4DT y fue respectivamente 0,1543, 0,1555 y 0,0129 para los ensayos de ORF, N-term y C-term. Después de descodificar este correspondía al percentil 98º, 998º y 99º. Basándose en esto el 8 %, 4 % y 60 % de las muestras diabéticas fueron positivas.

Como se ilustra en la Figura 6, una cantidad de sueros control dio uniformemente positivo con los ensayos ORF y N-term. El ensayo también fue menos sensible y mostró una señal reducida con respecto al ruido con respecto al ensayo C-term. Aunque la diferencia entre las muestras diabéticas y de control fueron significativas en todos los ensayos (ensayo de rangos de Mann Whitney P<0,0001), el ensayo más intenso fue con la construcción C-term (sonda C4 SEC ID: 24). El mejor resultado del ensayo C-term puede relacionarse con una mejor solubilidad de la sonda (sin dominios transmembrana) y/o la exposición de epítopos de otro modo crípticos.

El experimento mostrado en la Fig. 7 muestra que ZnT8 detecta autoanticuerpos en pacientes que son negativos para ICA y anticuerpos bioquímicos de patrón oro. El patrón oro original para la detección de autoanticuerpos diabéticos es ICA (anticuerpos citoplasmáticos de islotes) un ensayo complicado, laborioso y relativamente subjetivo que conlleva la exposición de secciones pancreáticas histológicas de sujetos humanos de grupo sanguíneo O contra

sueros seguido por incubación con un segundo anticuerpo marcado con fluorescencia y evaluación microscópica por un experto observador. No se ha reemplazado completamente por los ensayos de anticuerpo con 3 compuestos bioquímicos (Insulina GAD e IA2) dado que hay individuos que aún son negativos para el anticuerpo bioquímico ICA+vo. Por tanto para el ensayo de Prevención de Diabetes Grande 1 que implica más de 60000 sujetos, se usó ICA como el procedimiento para definir la autoinmunidad en una población de parientes de primer grado de alto riesgo de pacientes DT1.

El análisis de 30 sueros de pacientes de nueva aparición que fueron ICA positivos, pero negativos a insulina, GAD e IA2 mostraron que el 24 % eran reactivos a la sonda C-term ZnT8 lo que sugiere que ZnT8 puede ser un componente de los anticuerpos detectado en el ensayo ICA. Incluso más notable es el hallazgo de que 30 (20,3 %) de las muestras de individuos que eran negativos para ICA así como insulina GAD e IA2 dieron positivo para anticuerpos ZnT8. Esto indica que el epítopo detectado por la sonda C-term es quizás crítico en la molécula ORF, una conclusión que se originó en estudios posteriores. Existe la posibilidad de que la reactividad frente a ZnT8 puede no estar relacionada generalmente con la autoinmunidad, pero específicamente con la diabetes. Una serie de 24 muestras de individuos que dieron positivo para anticuerpos anti ADN fueron negativos en el ensayo de autoanticuerpos ZnT8.

Las Figuras 8A-C muestran la relación de autoanticuerpos contra ZnT8, con respecto a cada uno de Ins (Fig. 8A), GAD (Fig. 8B) e IA2 (Fig. 8C) en una población de nueva aparición. En este experimento, la relación entre autoanticuerpos contra la sonda C-term ZnT8 se comparó con 3 patrones de oro. Los datos derivan de 175 pacientes de nueva aparición en un conjunto de BDC. Los resultados se muestran como índice antigenético a una escala logarítmica para mostrar el intervalo completo de los datos y su solapamiento.

Las Figs. 9A-9D muestran la expresión de autoanticuerpos de aparición de enfermedad con respecto a la edad (Fig. 9A = ZnT8; Fig. 9B = GAD; Fig. 9C = Insulina; Fig. 9D = IA2). Específicamente, este experimento muestra que la seropositividad de ZnT8 es mayor en sujetos más mayores a la aparición de la enfermedad, mientras que disminuye la autorreactividad a insulina. Los datos derivan de 237 sujetos cuya edad a la aparición de diabetes varía de 9 meses a 18 años. Los datos se combinaron a intervalos de 1 año para derivar un perfil de frecuencia como una función de edad. La reactividad de C-term ZnT8 aumentó en función de la edad de aparición mientras que la reactividad a insulina mostró la disminución esperada como se observa en estudios publicados. La reactividad de GAD también tendió a aumentar aunque no de un modo tan drástico. Un marcador que detecta autorreactividad en sujetos mayores compensa la mala utilidad de la insulina como un marcador en individuos mayores. La aparición posterior de insulina de enfermedad no puede usarse como anticuerpos generados contra insulina exógena usada para tratar la enfermedad. Este experimento demuestra que los anticuerpos ZnT8 deben proporcionar un buen índice para detectar autoinmunidad latente de diabetes usando el envejecimiento (LADA o diabetes de tipo 1,5) que se diagnostica erróneamente frecuentemente como diabetes de tipo 2 en sujetos mayores y se trata de manera inapropiada. En los Estados Unidos hay una probabilidad de que muchos pacientes LADA sean pacientes de tipo 1.

Las Figuras 10A y 10B muestran los resultados de un experimento que investiga autoanticuerpos ZnT8 como un marcador predictivo de DT1. Un panel de muestras de 43 individuos a los que se había hecho un seguimiento durante 9 meses con respecto a la diabetes se ensayó retrospectivamente para los anticuerpos contra ZnT8 y los 3 anticuerpos patrones de oro contra la insulina GAD65 e IA2. Una serie de resultados de 9 individuos se muestra en este documento como ejemplos. La reactividad de los anticuerpos se expresa como rpm con probando menos control dividido entre la desviación típica de la respuesta control. El límite en el ensayo se define como el área gris que es equivalente a 3DT o aproximadamente una probabilidad del 1 % que un ensayo positivo podría generarse al azar. El paciente mostrado en los paneles de la Figura 10A no desarrolló autoanticuerpos contra insulina pero dio positivo a los 1,5 años de vida contra IA2 y GAD. Los autoanticuerpos IA2 se expresaron transitoriamente pero retornaron a la edad de 4 años. En el ínterin se desarrolló una alta reactividad y prolongada contra ZnT8. Después de esto los autoanticuerpos IA2 retornaron y 5 años después el individuo desarrolló diabetes clínica. El paciente mostrado en la Fig. 10B no desarrolló autoanticuerpos contra insulina, IA2 o GAD65 pero mostró Ab contra ZnT8 a la edad de 2, 18 meses antes de la enfermedad clínica.

La Figura 11 es una tabla que muestra el estado de autoanticuerpos diabéticos a la aparición de la enfermedad. La medición de autoanticuerpos ZnT8 proporciona un poder predictivo adicional contra los 3 autoantígenos patrones de oro IA2, insulina y GAD65. Estudios publicados muestran que la cantidad de anticuerpos detectada en lugar de la titulación de anticuerpos es el indicativo más fuerte de enfermedad. No obstante, algunas personas desarrollaron DT1 sin incluso presentar anticuerpos contra los 3 anticuerpos patrones de oro IA2, GAD65 e insulina. Esto indica que hay reactividades perdidas, una conclusión que se origina por un ensayo inmunohistoquímico de autoantígenos que detecta más pacientes que las mediciones combinadas de Ab INS, GAD e IA2. El ensayo ICA sin embargo es laborioso y subjetivo. Para un individuo que solo presenta uno de los anticuerpos patrones de oro el riesgo relativo de desarrollar la enfermedad a los 5 años es lento, sin embargo 2 o más anticuerpos sugieren un mal pronóstico y podría ser un indicativo de una intervención terapéutica si esta estuviese disponible. La parte superior de la Figura 11 muestra el estado del anticuerpo en el diagnóstico clínico de individuos que desarrollaron diabetes. Los resultados son de un estudio enmascarado de 50 sujetos diabéticos de nueva aparición y 100 controles de la misma edad proporcionados por el Programa de Estandarización de Autoantígenos Contra la Diabetes y los datos se muestran en los portaobjetos previos. Con adición de ensayos para la autorreactividad de ZnT8 la cantidad de

individuos que eran negativos a los anticuerpos disminuyó significativamente del 14 al 8 % y adicionalmente el 12 % se denominaron como alto riesgo. De otra manera, de los 7 individuos que podrían estratificarse como negativos para anticuerpos, el 43 % realmente tuvo anticuerpos contra ZnT8. De 7 individuos en el grupo "alto riesgo" 1Ab, de nuevo, 3 (43 %) dieron positivo para los anticuerpos ZnT8 poniéndolos en la categoría de riesgo más alto.

- 5 Del patrón de oro 3, los autoanticuerpos de insulina son difíciles de medir y hay una mala reproducibilidad con el ensayo entre los laboratorios. Si el ensayo de insulina se descartara y se reemplazara por el ensayo de ZnT8 tendría la ventaja de que el número de pacientes 0Ab aún se redujese del 14 al 8 % y habría números comparables de pacientes doble y triple positivos. Se requiere realizar estudios longitudinales para mostrar que hay un poder de diagnóstico adicional, aunque es razonable suponer que ZnT8/GAD/IA2 sería una mejor combinación que INS/GAD/IA2. Además, sería posible impedir el uso del ligando marcado con ^{125}I y realizar la preabsorción del antígeno según sea necesario para el ensayo anti insulina.
- 10 La parte de la Figura 11 documenta como los anticuerpos se distribuyen entre pacientes en diferentes categorías. Los anticuerpos ZnT8 C term a menudo aparecen como el único anticuerpo en este grupo, similar a GAD de nuevo confirmando su valor predictivo. En una población seleccionada de individuos que eran ICA positivos pero negativos para los 3 patrones de oro, el 25 % fueron positivos a ZnT8 C-term.
- 15 Las Figuras 12A y 12B muestran características operadoras de receptor de los ensayos de anticuerpo ZnT8. Los datos proceden de una combinación de pacientes de nueva aparición del Centro de Barbara Davis en Denver, Colorado, y un conjunto de muestras proporcionado por DASP. La combinación incluye individuos que varían de 1,5 años a 59 años de vida a la aparición. Los límites se determinan a partir del límite 3DT de un grupo de 16 sueros control correspondientes. Se generaron representaciones ROC por comparación del grupo de control y diabético en cada caso. La Figura 12A muestra el índice de inmunoprecipitación, y la Figura 12B muestra la relación entre la sensibilidad y especificidad de cada ensayo.
- 20 La Figura 13 muestra la relación entre la reactividad contra sondas ZnT8ORF, C-term y N-term. Los datos proceden de una combinación de pacientes de nueva aparición del Centro de Barbara Davis y un conjunto de muestras proporcionado por DASP dando un total de 227 individuos. Los 50 primeros pacientes C-term positivos incluían la mayoría de individuos que dieron positivo para la reactividad contra la sonda ZnT8 ORF y ZnT8 N-term. Hubo una correlación significativa entre la reactividad contra la sonda N-term y la ORF pero no entre la sonda ORF y la C-term. Esto sugiere que los epítopos implicados en la reactividad N-term son un subconjunto de aquellos detectados por la sonda ORF, pero que C-term seleccionaba pacientes adicionales seleccionados y fue un mejor indicador de autorreactividad que el producto de traducción ORF. Esto podría producirse por que la sonda ORF no se pliega correctamente debido a errores de plegamiento en la región transmembrana y altera el plegamiento del C-term normal. El C-term incluiría epítopos adicionales algunos de los cuales podrían ser crípticos a menos que se liberan de la molécula intacta.
- 25 El experimento de las Figuras 14A y 14B investiga si el N-term y C-term de ZnT8 interaccionan para generar un nuevo epítopo que depende de los dos dominios o si las secuencias N-term pueden ocultar epítopos en el extremo C.
- 30 El experimento se realizó con 2 grupos de suero de diabéticos que tuvo una respuesta fuerte contra una sonda C-term pero bien una reactividad baja (Fig. 14A) o bien alta al N-terminal (Fig. 14B). Con ambas mezclas, fue obvio que la reactividad contra N-term y C-term eran independientes, y que la radiactividad inmunoprecipitada cuando las sondas se mezclaron fue equivalente a la suma de las sondas individualmente. Otras variaciones en este experimento incluyen la adición de iones Zn o quelación de Zn endógeno como un factor positivo que podría estar implicado en la interacción de estos dominios. Los resultados eran indiferenciables de los anteriores sugiriendo que las interacciones N y C-term no afectaban a la inmunorreactividad.
- 35 En referencia a las Figuras 15A-15C, estas figuras muestran resultados de experimentos cuyo objetivo es la localización de epítopos de autoanticuerpos en el extremo C de ZnT8. La Fig. 15A muestra las secuencias alineadas de Slc30A8 murino (parte superior; se muestran posiciones 267-367 de la SEC ID Nº: 4), S1c30A8 humana (central; muestran posiciones 268 a 369 de la SEC ID Nº: 2) y Slc30A3 murina (inferior; la secuencia es la SEC ID Nº: 25). Dado que la Slc30A8 y la Slc30A3 de ratón no se reconocen por la mayoría de los sueros de DT1, los datos revelan que restos variantes probablemente mantienen la clave para predecir el epítopo en la secuencia de Slc30A8 humana. Los inventores llegaron a la hipótesis de que los 11 aminoácidos finales (PDCLFCEDPCD; posiciones 359-369 de la SEC ID Nº: 2) podrían por tanto ser el epítopo antigénico; sin embargo las sondas que delecionan esta región (digestión BstN1, Fig. 15B; la secuencia de referencia que muestra sitios de restricción es la de las posiciones 336-369 de la SEC ID Nº: 2) se inmunoprecipitaron tan eficazmente como el C-term del tipo silvestre mediante un grupo de 9 sueros de diabéticos (Fig. 15B). Recortando otros 6 aminoácidos se redujo la unión de autoanticuerpo, y recortando 12 aminoácidos se anuló la unión de anticuerpos, lo que sugiere que esta región es especialmente importante. Las secuencias para estas sondas se proporcionan en la Tabla 1 del presente documento.
- 40 Como se muestra en la Figura 15C, las sondas C-term se prepararon con mutaciones puntuales en restos cargados (K340, H345 y E352) que posiblemente contribuyen a la antigenicidad y contra la Serina 353 que es un supuesto sitio de fosforilación para la caseína quinasa y es posible que esté posttraduccionalmente modificado. Cuando se

ensayan con el mismo conjunto de sueros diabéticos, es obvio que cada uno de estos restos contribuye a la inmunorradioactividad y se demuestra que es aditivo en el mutante con todos los 3 restos cargados que se cambiaron por (AAA). Las secuencias de estas sondas se proporcionan en la Tabla 1 del presente documento.

- 5 Se realizaron experimentos adicionales con péptidos sintéticos de 20 unidades oligoméricas solapantes que cubren esta región como posibles agentes bloqueantes (datos no mostrados). Su capacidad para bloquear la unión fue la más moderada (<33 % reducción), lo que sugiere que el epítopo del autoanticuerpo es probablemente conformacional por naturaleza y no una simple secuencia lineal. Una estrategia adicional es crear moléculas químéricas de Slc30A8 y Slc30A3 que conservan la conformación general de la región C-term pero permiten 10 intercambiar secuencias críticas en y fuera con alteraciones de la estructura secundaria. Estas moléculas químéricas también servirán para mapear respuestas de linfocitos T a la proteína.

La Figura 16 muestra restos en el C-term de ZnT8 que son críticos para la autorreactividad e ilustra la conservación del epítopo definido entre especies animales. Mutantes de truncado y mutación (descritos en la Tabla 1 anterior) indican que la secuencia núcleo SLTIQMES (posiciones 346-353 de la SEC ID Nº: 2) es crítica para la reactividad de anticuerpos contra la Slc30A8 humana y que los restos individuales E352 y S353 realizan contribuciones importantes a la unión del anticuerpo. La secuencia global se conserva bien en especies de vertebrados diferentes de Slc30A8 pero menos bien en los homólogos de mamíferos más próximos Slc30A2 y Slc30A3. La última proteína 15 se expresa como un fragmento C-term no detectado por autoanticuerpos diabéticos.

20 De manera interesante, se observan especies homólogas en proteínas de flujo catiónico (distintas de CzcD) de especies de bacterias más distamente relacionadas y en dos proteínas no relacionadas, una proteína de transferencia de conjugación de *E. coli* y la REEP3 humana. Esto genera la posibilidad de que la imitación molecular podría desempeñar una función en el desarrollo de la autorreactividad contra el transportador de cinc en el ser humano o podría contribuir a la dispersión epitópica de antígenos y una activación de testigo de la respuesta inmunitaria.

25 En resumen, ZnT8 es un marcador serológico independiente de autoinmunidad que precede la diabetes de tipo 1 y se espera que sea particularmente útil prediciendo la transición de la autorreactividad en curso a diabetes incipiente.

30 El formato de ensayo descrito en el presente documento permite explorar hasta 500 muestras al día y podría automatizarse fácilmente aumentando su capacidad. El hecho de que los sujetos humanos tengan autoanticuerpos contra ZnT8 indica que una respuesta de células T autorreactiva es altamente probable. A su vez esto significa que 35 los ensayos de diagnóstico adicionales pueden desarrollarse como se ha descrito con detalle anteriormente, así como una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento y prevención de la diabetes de tipo 1, que también se describe con detalle anteriormente.

Ejemplo 4

40 El siguiente ejemplo describe el mapeo epitópico de autoanticuerpos adicional de ZnT8 usando mutantes de delección y quimeras de ratón/humano.

45 En este experimento, cuyos resultados se reflejan en la Figura 17, los límites de la región que incorpora los sitios de unión del autoanticuerpo C-term se mapearon usando una serie de péptidos ZnT8 en los que los extremos NH₂ o COOH estaban truncados, o preparando quimeras de secuencias ZnT8 de ser humano y ratón, siendo la última no inmunorreactiva en el ensayo estándar. El grado de solapamiento se representa a escala y el grado de delección se muestra como números de aminoácidos deletreados (diagramas de delección) o el número de posición de aminoácido en el que las proteínas de fusión se unen entre sí, precedida por el aminoácido como un código de una sola letra (diagramas quimera).

50 La estructura cristalina del transportador de flujo de salida catiónico Yip de *E. coli* se usó para generar un modelo tridimensional del C-term de ZnT8 humano usando MODELLER (Fig. 18). Los restos destacados en gris claro varían entre la secuencia de ser humano y ratón, los restos destacados en gris medio se designaron como candidatos antigenicos pobres basándose en análisis inmunológico de construcciones de delección NH₂ y COOH. El resto 55 polimórfico en la posición 325 en ZnT8 humano se muestra en el modelo spacefill como restos en color gris oscuro (todas las posiciones de esta figura son con respecto a la SEC ID Nº: 2).

60 Las variantes polimórficas humanas principales de ZnT8 en la población Caucásica, Trp325 y Arg325, se encuentran distales a la membrana en el polo citoplasmático de la estructura y están rodeadas en su mayor parte de restos que 65 están conservados entre seres humanos y ratones. La cadena lateral de Arg se extiende en el disolvente, mientras que el anillo de indol Trp se dobla de nuevo sobre la molécula para crear posiblemente una superficie muy diferente sin distorsionar el plegamiento global. La variante Gln325, aunque próxima en geometría a la cadena lateral Arg se predice que da como resultado la rotación de la estructura de aproximadamente Ser353. Un grupo de restos variantes del segundo segmento helicoidal alfa (aa328-341) cuya topología está en gran medida inafectada por el polimorfismo se postula que es un fuerte candidato para un epítopo que se reconoce igualmente por sondas que portan las variantes polimórficas. La adyacencia exposición a disolvente de Arg332, Glu333, Arg336 y Arg340 son

notables en este sentido.

En referencia ahora a la Figura 19, se muestra la conservación de restos ZnT8 en las regiones diana por autoanticuerpos DT1. El extremo N es la diana para anticuerpos en aproximadamente 5 % de pacientes mientras que hasta el 80 % de sujetos DT1 muestra autoanticuerpos contra el extremo C. Las construcciones en el inicio y final del extremo C se han preparado para mapear los límites de los epítopos en el C terminal. El área oscura en gris es donde más autorreactividad se expone. La comparación de la secuencia ZnT8 de ratones, seres humanos y sapos indica que mucha de la región epítópica está conservada, con la excepción de los aminoácidos 322-341 (referente a la SEC ID Nº: 2). Esta región incorpora una variante polimórfica principal en seres humanos (325R o 325W) que no se encuentra en otras especies.

Ejemplo 5

Los siguientes ejemplos describen experimentos relacionados con realizaciones de la invención dirigidos a polimorfismos en el gen y proteína ZnT8.

El extremo C de ZnT8 de ratón se diferencia del ZnT8 humano en 18 aminoácidos de 104 y no es reactivo con los sueros diabéticos de nueva aparición. Se generaron construcciones basadas en la secuencia de ratón en las que los aminoácidos variantes se sustituyeron por sus homólogos humanos bien en copias sencillas o múltiples. Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras 21A-21C. Cada punto de dato es la medida de 2-7 respuestas determinado con suero humano que se habían categorizado previamente como limitada a la variante polimórfica Arg325 humana (CR) o Trp325 (CW) o reactivos a un grado igual a las variantes humanas Arg325, Trp325 o Gln325 (CQ). La numeración de aminoácidos hace referencia a las posiciones de secuencias en seres humanos (SEC ID Nº: 2).

Los resultados muestran que un cambio del aminoácido 325 en su homólogo humano restablece la unión por sueros restringidos a CR y CW pero solo con el aminoácido correspondiente. Ningún cambio de aminoácido solo reestablece la reactividad de sueros respondedores a CQ. Sin embargo, la sustitución combinada de los aminoácidos 332, 333, 336 y la inclusión de un aminoácido ausente en la secuencia de ratón en la posición aa340 restableció la reactividad. Se potenció adicionalmente por inclusión de Arg en la posición 325.

Las Figuras 22A-22D muestran que la mutación multisitio de ZnT8 de ratón recapitula la reactividad de ZnT8 humano. En este experimento, la Fig. 22A muestra que una sola mutación puntual de la secuencia de ratón, mientras que aún es capaz de detectar diversas respuestas de anticuerpos reactivos a Arg, no reacciona con la mayoría de los sueros. Sin embargo, mutación adicional de 4 restos basada en diferencias en estructuras humanas y de ratón (mutantes REKK) hizo la secuencia de ratón casi tan reactiva como la estructura nativa Arg 325 humana (Fig. 22B). La misma sonda no se observó por la mayoría de los sueros reactivos a hTrp (Fig. 22D). Los mismos sueros reaccionaron débilmente con la sonda únicamente de mTrp (Fig. 22C).

En un experimento adicional, ilustrado en las Figs. 23A-23D, ZnT8 de 171 sujetos con DT1 de nueva aparición se ensayó con sondas mQ>R325, mQ>W325, hR325, hW325 y hQ325, y los datos se calcularon con respecto al anticuerpo anti C-term de conejo (BUN-E). 32 individuos mostraron unión de anticuerpo limitada a hArg325, 19 de los cuales mostraron respuestas contra sondas mArg325. 13 mostraron unión de anticuerpo limitada a hTrp325, 10 de los cuales mostraron respuestas a sondas mArg325. La unión a mArg325 o mTrp325 no se observó en ausencia del homólogo humano. Las respuestas limitadas a Arg325 se correlacionaron entre ser humano y ratón y fueron de magnitud similar después de la corrección de la unión representada mediante la sonda hQ325. La unión de la sonda mTrp325, aunque mapea sobre la respuesta limitada a hTrp325, fue de una menor longitud incluso después de la corrección para la unión de hQ325. Estos datos indican que el aminoácido en la posición 325 es un determinante de la especificidad epítópica del autoanticuerpo, y en el caso de la variante Arg, la mutación puntual de ratón se asemeja a la conformación humana nativa.

En otro experimento, la respuesta de autoanticuerpo ZnT8 en pacientes DT1 de nueva aparición se determinó con variantes de aminoácidos 325. Sondas C terminales mutantes basadas en las variantes Arg, Trp y Gln de ZnT8 325, se usaron para determinar la respuesta inmunitaria humoral en 300 pacientes de nueva aparición. La Fig. 24D muestra el nivel y frecuencia de la respuesta segregada basándose en la respuesta a sondas individuales o combinaciones de sondas. La Fig. 24C muestra la relación entre las respuestas a las variantes habituales Arg y Trp y se divide en 5 sectores basándose en un límite de percentil 95 para respuestas solamente Trp (vertical) y Arg (horizontal) y las diagonales representando las respuestas equivalentes límites \pm 3DT de ambas sondas que se suponen a un 15 % CV del ensayo. La Fig. 24A y 24B usa la misma estratificación examinando la relación entre las respuestas a la sonda Gln y a las sondas Arg y Trp.

La Figura 25 muestra la relación entre la especificidad de autoanticuerpos ZnT8 y genotipo del paciente (SNP rs13266634) para el codón en el aminoácido 325. Los sujetos DT1 recién diagnosticados se genotipificaron con sondas TaqMan y los sueros se ensayaron con las construcciones C-term ZnT8 humanas que incorporaban Gln (Q), Arg (R) o Trp (W) en la posición aa325. Los límites de ensayo se establecieron a un índice de 0,02. En los casos en los que la señal entre R o W superaba la de la sonda Q se suponía que el CV de las mediciones respectivas era del 15 % y se designó que tenía reactividad dual positiva si los índices diferían en >3DT.

Existen importantes conclusiones para extraer de estos datos:

- 5 1) La reactividad frente a la sonda Gln (hCQ) está relativamente inafectada por el genotipo, mientras que la reactividad Arg (hCR) es más notable en individuos con el alelo C (que codifica Arg) y la actividad Trp con el alelo T (que codifica Trp).
- 10 2) Solamente un individuo de 300 se mostró que reaccionaba con la sonda hCQ pero no con hCW o hCR. El individuo posiblemente codifica un resto Gln en aa325 (análisis de secuenciación de nucleótidos). Los individuos que muestran una respuesta limitada a Arg (solo Arg) tenían todos el alelo C codificante. Los individuos que mostraban una respuesta limitada a Trp (solo Trp) tenían todos el alelo T codificante. Lo mismo fue esencialmente cierto para individuos que mostraron reactividad hCR y hCW que superó la reactividad hCQ.
- 15 3) Individuos que mostraron reactividad a hCR y hCW pero no a hCQ eran principalmente heterocigotos.

15 Estos datos se resumen en la Figura 26, que muestra la correlación entre el genotipo y reactividad contra las sondas hCR y hCW. Más particularmente, la Figura 26 resume los descubrimientos principales de que la reactividad limitada al epítopo Arg325 está fuertemente asociada con el alelo C y en particular el genotipo CC, y a la inversa que la reactividad del anticuerpo limitada al epítopo Trp325 está asociada con el alelo T y particularmente al genotipo TT.

20 La Figura 27 muestra el genotipo Slc30A8 en relación con la edad de aparición de la diabetes. No existe una correlación obvia entre el genotipo y la edad a la cual se diagnostica la DT1. Sin embargo, se requieren más muestras para llegar a la conclusión, por ejemplo, de que es menos probable que los individuos con genotipo TT desarrollen la enfermedad antes de la edad de 6, aunque la tendencia existe y la conclusión es importante en términos de intervención.

25 Existe alguna distorsión del genotipo en la población diabética de los presentes inventores frente a la indicada en la bibliografía de sujetos de control. Los inventores observan un 56,8 % CC, 35,1 % CT y 8,1 % TT (n=285). La frecuencia genotípica indicada en una población Europea es de 52,3 % CC, 44,1 % CT y 3,6 % TT (n=168) P=0,05 ensayo exacto de Fisher. Sin embargo la frecuencia alélica de 74,4 % C y 25,6 % T es idéntica en ambas poblaciones. La distribución de genotipos no es notablemente diferente de la distribución de Hardy Weinberg (55,33 % CC, 38,11 % CT y 6,56 % TT). Las diferencias son más obvias si se busca en los heterocigotos frente a los homocigotos TT (P=0,026) y podría sugerir que hay más genotipos TT y menos heterocigotos.

30 Los estudios de población no indican la existencia de genes asociados a DT1 en el cromosoma 8 en la región en la que se localiza Slc30A8. Un análisis SNP de genoma completo sin embargo muestra una asociación del alelo T de Slc30A8 con *diabetes de tipo 2* y dicha asociación requiere el análisis de aproximadamente 8000 sujetos para detectar mostrando una relación de probabilidad de aproximadamente 1,2 y un valor P<0,05.

35 Una característica interesante de los datos inmunológicos y genéticos combinados fue la observación de que la frecuencia de anticuerpos limitados a Arg era mayor en el grupo CC homocigoto que los heterocigotos y, del mismo modo, los anticuerpos limitados a Trp eran mayores en el grupo TT homocigoto que en los heterocigotos. Esto podría ser en parte un efecto de dosificación de genes asociándose una mayor expresión de antígeno con más autorreactividad.

40 En las Figuras 28A-B, el nivel de reactividad de autoanticuerpos se muestra con respecto a la sonda usada y el genotipo Slc30A8. El genotipo CC se representa por 169 muestras, el CT por 108 y el TT por 23. Se predice que la sonda hC Gln de ZnT8 refleja la unión del anticuerpo al epítopo REKK solo, mientras que la sonda hC Arg se une tanto a este epítopo como al epítopo centrado en los restos Arg 325. La sonda Trp hC se indica en la unión de REKK y en el epítopo centrado en Arg 325. Los niveles medios y frecuencia de la reactividad hCArg están afectados por el genotipo en la dirección esperada, es decir, aumentando la reactividad asociada con la frecuencia del alelo C (que codifica Arg 325) (Fig. 28A). Del mismo modo, los niveles medios y frecuencia de reactividad hCTrp aumentan con la frecuencia del alelo T (que codifica Trp325) (Fig. 28A). La reactividad de hC Gln tendió a aumentar con el alelo C aunque no significativamente con respecto a la frecuencia o el nivel (Fig. 28A). La reactividad con otros autoanticuerpos bioquímicos, IAA, GADA e IA2A no se vio afectada por el genotipo Slc30A8 (Fig. 28B).

45 55 Los experimentos que resumen el estado actual del desarrollo de los ensayos de ZnT8 se muestran en la Figura 29. Los ensayos se realizaron en una serie de muestras ocultas proporcionadas por el Diabetes Autoantigen Program (DASP) del Centro de Control de Enfermedades (CDC) que comprende 50 pacientes de diabetes de nueva aparición y 99 controles. Los ensayos se realizaron usando el formato de radioinmunoprecipitación básica con sondas radiomarcadas con ³⁵S metionina traducidas *in vitro* basadas en sus secuencias ZnT8 de ratón (r) o humano (h).

60 60 Todas las sondas incorporaron el extremo C de 104 aa (C) de ZnT8 con un Gln (Q) (SEC ID N°: 50), Arg (R) (SEC ID N°: 49), o Trp (W) (SEC ID N°: 51) en la posición 325 de aminoácido humano. Además se generaron sondas por fusión del extremo N de 74 aa (N) de ZnT8 al extremo C usando una secuencia conectora de 3 restos de glicina por ejemplo hNCW o creando un dímero del extremo C que tenía una construcción hCW unida a una construcción hCR a través de un brazo conector flexible (SEC ID N°: 52) para generar la construcción hCWR (SEC ID N°: 60). El brazo conector derivó de la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina que se sabe que proporciona una conexión flexible entre las regiones constante y variable de esta secuencia. El conector (secuencia

PSTPPGSSGG; SEC ID Nº: 52) posiblemente permite que una molécula de un solo anticuerpo se una con alta avidez ya que puede conectarse a 2 sitios de las sondas. Como alternativa, la sonda puede unir dos moléculas de anticuerpos simultáneamente incluyendo inmunoglobulinas de diferente especificidad epítópica.

- 5 Los resultados que se obtienen con exactamente las mismas muestras ilustran gran cantidad del estado actual de la técnica y características de autorreactividad diabética en particular:
- 1) La baja reactividad de anticuerpos DT1 humanos hacia la secuencia de ratón nativa (SEC ID Nº: 40) en comparación con su homólogo humano (hCQ) (SEC ID Nº: 50) {mCQ frente a hCQ}.
 - 10 2) Unión aumentada de anticuerpos a ZnT8 de ratón mediante una sola mutación puntual que reemplaza el resto Gln en el aminoácido 324 (SEC ID Nº: 41) (equivalente al aa325 humano) con un resto Arg (SEC ID Nº: 49) {datos mCQ frente a mCR}.
 - 15 3) La reactividad diferencial frente a sondas humanas que llevan un solo cambio de aminoácido en la posición 325 (invariablemente la frecuencia de anticuerpos en la aparición está en el orden de hCR>hCW>hCQ). Esto es porque las sondas hCR (SEC ID Nº: 49) y hCW (SEC ID Nº: 51) tienen epítopos adicionales centrados en la posición aa325 y porque los anticuerpos hacia la variante Arg se producen más frecuentemente que la variante Trp en la población de los inventores, que es en su mayor medida Caucásica.
 - 20 4) La fusión del extremo N con el extremo C W (SEC ID Nº: 62) o R (SEC ID Nº: 63) variante introduce la posibilidad de incorporar epítopos N terminales reconocidos por el 5-8 % de la población DT1 junto con los C terminales más reactivos. Sin embargo la frecuencia global de los anticuerpos medidos de esta manera es realmente más baja que la de las sondas C-term en solitario debido al fondo y por lo tanto el límite en el ensayo es más alto. Después de modificar por ingeniería genética la molécula esto se corregirá.
 - 25 5) La fusión de los dominios CW y CR en una molécula (SEC ID Nº: 60) creó una sonda que detecta la autorreactividad en individuos que eran reactivos a sondas CR, CW y CQ. Además, la señal era mayor en los sujetos diabéticos sin ningún sacrificio en el fondo resultante en un ensayo con superior comportamiento que una combinación de 3 ensayos diferentes. Es concebible que la multimerización adicional de la sonda puede aumentar los niveles de detección incluso más. Al 78 % la tasa de detección es tan alta o más que cualquier otro marcador de autoanticuerpos bioquímico diabético.
 - 30 30 La Figura 30 muestra autorreactividad contra diferentes construcciones de ZnT8 que combinan N-term, C-term, bucles luminas, bucles citosólicos y restos polimórficos. hCTrp menos TM (SEC ID Nº: 67) es una construcción que incorpora los 3 bucles extracelulares (luminas) y 2 citosólicos que conectan los 6 dominios transmembrana, diseñados para capturar cualquier epítopo que resida en estos bucles. Detecta un 4 % extra de pacientes de nueva aparición. hCArGN incorpora tanto el extremo N como el C pero en orden inverso (SEC ID Nº: 66). Los niveles de anticuerpos medidos mediante estas sondas se correlacionan con los medidos con hCArG solo, pero también captura algunos pacientes adicionales, particularmente aquellos que muestran bajos niveles de reactividad. Los datos tambien ilustran que el cambio de polimorfismo Arg por Trp en la posición 325 identifica un número significativo de pacientes que se limitan a la respuesta de anticuerpo contra hCArG o hCTrp solo además de pacientes que reaccionen igualmente o independientemente de epítopos que incorporan el aminoácido 325.

Ejemplo 6

El siguiente ejemplo proporciona datos adicionales respecto a ZnT8 como una nueva diana y marcador para la diabetes de tipo I.

- 45 Las Figuras 31A-F muestran resultados de un estudio en el que autoanticuerpos contra ZnT8 se comparan con el péptido C (2 horas postprandial) y otros autoanticuerpos a lo largo del tiempo en un grupo de 23 sujetos con DT1 de nueva aparición. El resultado principal de este análisis es que los autoanticuerpos para ZnT8 disminuyen tras la aparición de la enfermedad con cinéticas que son similares a la pérdida de la masa de células beta como se refleja en la disminución en respuestas de C-péptido. Estos datos conducen a los inventores a sospechar inicialmente que hubo variación genética en las moléculas como en las Figuras 31A-31C, pueden observarse respuestas contra una construcción C-term que algunas veces son equivalentes a una construcción de fusión N-C (Fig. 31 A) o muy diferentes (Figs. 31B-C). Cuando estas sondas volvieron a secuenciarse, se observó que C-term tenía la versión Arg325 (SEC ID Nº: 49), y el N-C, la versión Trp325 (SEC ID Nº: 64) de la molécula. Las variantes polimórficas se introdujeron usando dos fuentes de isletos diferentes para la clonación o clonación de productos de un individuo heterocigoto. La disminución media anual en la reactividad para el extremo C fue de $26 \pm 13\%$, N/C $28 \pm 9\%$, C-pep $32 \pm 14\%$, IA2 22 ± 11 (\pm DT n=15). A diferencia GADA aumentó en un $42 \pm 191\%$ posiblemente porque hay otra fuente tisular de este antígeno.
- 50 60 La Figura 32 muestra los niveles de ZnT8A y péptido C 5-10 años después de la aparición. Un seguimiento del estudio previo (descrito en los Ejemplos anteriores) de 10 años muestra que los anticuerpos disminuyen homogéneamente en individuos y que aquellos con niveles altos inicialmente son más persistentes. La seroconversión se produjo en aproximadamente 60 % de las muestras a los 5 años o más y en todos los casos los niveles disminuyeron en promedio al 90 %. Las muestras con niveles de Ab bajos (<0,4) tendieron a seroconvertirse más rápidamente. Algunas muestras con altos niveles de anticuerpos tenían masa de células beta residual según se indica mediante un péptido C aleatorio positivo.

La medición de autoanticuerpos ZnT8 además de la insulina, GAD e IA2 se ha descrito en Ejemplos anteriores del presente documento. En estos ejemplos, los inventores solo midieron la reactividad hCR, que podría haberse excluido de la reactividad Trp325. La Figura 33A ilustra adicionalmente el concepto como el cambio en la tasa de detección (negro con ZnT8; blanco sin). La Figura 33B muestra el efecto diferencial de añadir la medición del anticuerpo ZnT8.

Ejemplo 7

10 El siguiente ejemplo describe experimentos de preadsorción de autoanticuerpos que muestran la utilidad de las proteínas recombinantes para diferenciar entre diferentes epítopos ZnT8.

15 Se han generado diversas moléculas recombinantes de ZnT8 usando vectores tales como pGEX (produce la proteína de fusión Glutatión S transferasa que puede purificarse en glutatión agarosa) o series pQE (produce la proteína marcada con polihistidina en el extremo N o C de la proteína que puede purificarse mediante cromatografía con quelatos metálicos). Sin embargo, estos demuestran producir cuerpos de inclusión insolubles que son difíciles de purificar y no se pliegan apropiadamente para recrear los epítopos autoantigénicos. Los inventores encontraron una solución usando un vector (vector pET43.1, Novagen, EMD Biosciences) que incorpora tanto una etiqueta His para una purificación de afinidad de quelatos metálicos y una compañera de fusión de proteína que es una chaperona bacteriana y garantiza el plegamiento apropiado. Las proteínas se expresan en bacterias BL-21(DE3) (Novagen).

20 Las proteínas del extremo C NUS hZnT8 basadas en la SEC ID Nº: 49 (variante Arg325), SEC ID Nº: 50 (variante Gln325) y SEC ID Nº: 51 (variante Trp325) se generaron y purificaron sobre columnas de quelato Ni y 20 microgramos de muestras se incubaron con sueros TID durante 2 h a temperatura ambiente antes de la adición de sondas hCArg, hCTrp y hCGln marcadas con 35S Met y el comportamiento del ensayo de radioinmunoprecipitación convencional.

25 En el experimento mostrado en la Fig. 2C, se seleccionaron tres sueros que se sabía que estaban limitados a Arg 325 (suero Nº 541827 denominado hCArg), a Trp325 (suero Nº 533855 denominado hCTrp) y que reaccionaban con epítopos compartidos por todas las construcciones hC-term independientemente del aminoácido en la posición 325 (suero Nº BT denominado hCGln).

30 Los resultados muestran especificidad notable de los sueros que están limitados a los epítopos definidos por el polimorfismo en la posición 325. Los resultados también muestran que las construcciones Trp y Arg no pueden diferenciarse por los 325 sueros no limitados. En términos prácticos, esto proporciona un mejor medio de determinar la reactividad relativa de un suero contra epítopos Arg325, Trp325 y no limitados cuando estos se representan en la misma muestra. Actualmente, se usan tres ensayos radiológicos usando un solo patrón C terminal panreactivo externo (BUN-E) para calibrar las respuestas y después los números se restan entre sí. Con las proteínas 35 actualmente disponibles recombinantes descritas en el presente documento, el nivel de reactividad puede determinarse usando la sonda relevante y determinando el grado al cual la señal se aplaca por diferentes proteínas recombinantes.

40 Por lo tanto, la disponibilidad de proteínas de fusión basadas en ZnT8, tales como las proteínas de fusión hCNUS descritas en el presente documento, que muestran la especificidad epítópica esperada, es una etapa importante en la producción de ensayos de autoanticuerpos en fase sólida que están basados en procedimientos no isotópicos.

Ejemplo 8

45 El siguiente ejemplo describe la producción del vector adenoviral que codifica hZnT8 y su expresión en células hospedadoras.

50 Los inventores también produjeron vectores adenovirales para la expresión de hZnT8 de longitud completa. Células Cos7 se transdujeron con adenovirus control (AdLacZ) o Ad-hZnT8-V5-His a una MOI (multiplicidad de infección) de 100. Cuarenta y ocho horas después, las células se recogieron y la expresión se controló mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia con un anti-hZnT8 de conejo polyclonal (datos no mostrados). La β-glucuronidasa (GUS) o hZnT8-V5-His se tradujeron *in vitro* (kit CECF de germen de trigo RTS 100, Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se analizó 1 µl (2 %) de la mezcla mediante transferencia de western. La expresión de la proteína hZnT8 se detectó (datos no mostrados).

Ejemplo 9

55 El siguiente ejemplo muestra la localización inmunohistoquímica de ZnT8 en diversas células.

60 65 La célula INS-1 es una línea de células beta derivada de células beta pancreáticas que proporciona un buen modelo de cultivo celular de las células beta. El anticuerpo usado en el análisis anterior se generó contra una proteína de

fusión recombinante denominada BUN-E y se usó para identificar la localización intracelular de ZnT8 codificada por el gen Slc30A8. El anticuerpo destaca orgánulos intracelulares punteados de un tamaño aproximado de 0,2-0,5 micrómetros (datos no mostrados). Estos se distribuyen en la célula en un modelo similar al de la insulina que marca el gránulo de insulina en donde estudios previos habían localizado ZnT8. Los estudios inmunohistoquímicos de los inventores descritos en este ejemplo (datos no mostrados) indican que ZnT8 no está totalmente en el gránulo sino que muestra solapamiento parcial con un marcador de red transGolgi TGN38. No se localiza con el marcador endosómico temprano EEA1 o con el endosoma de reciclado marcado por el receptor de transferrinas sin embargo el solapamiento sustancial se produce con LAMP1 un marcador de lisosomas maduros. Generalmente, estos datos no están de acuerdo con los informes previos de que ZnT8 es exclusivamente una proteína granular secretora (Chimienti *et al.*, citado anteriormente).

Ejemplo 10

El siguiente ejemplo muestra que la PCR en tiempo real de páncreas fetal humano muestra que ZnT8 tiene una alta especificidad de islotes a diferencia de los miembros relacionados de la familia de genes (ZnT1-7 y ZnT9).

Se obtuvo páncreas fetal humano a las edades indicadas, se extrajo ARNm y se usó para la determinación de niveles de expresión en el desarrollo (9 y 23 semanas de gestación) e islotes adultos. A las 9 semanas, el páncreas está principalmente comprendido de tejido mesenquimal indiferenciado. A las 23 semanas la macroanatomía es similar a la del adulto y muestra expresión sustancialmente aumentada de ZnT1 (Slc30A1) y especialmente ZnT8 (Slc30A8), véase Fig. 34. Los islotes aislados tienen menos ZnT1 ya que este está principalmente confinado al tejido exocrino.

Ejemplo 11

El siguiente ejemplo demuestra que pacientes DT1 recientemente diagnosticados muestran respuestas de células T periféricas contra péptidos sintéticos ZnT8.

Este experimento muestra la producción de IFN- γ dependiente de hZnT8 por CMSF de sujetos recientemente diabéticos. Las CMSF se aislaron de 4 sujetos recientemente diabéticos y se cultivaron durante 48 h con conjuntos de 2 péptidos hZnT8 consecutivos (10 μ g/ml) que abarcan toda la secuencia ZnT8 humana con péptidos de 20 unidades que solapan 7aa. Después de lavar las células se transfirieron a placas ELISPOT recubiertas con un anticuerpo anti-IFN- γ monoclonal y se cultivaron durante 17 h más. Después de lavado para eliminar las células y los medios, la citocina secretada se detectó usando un segundo anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ biotinilado, GABA y una solución de plata precipitante. Las manchas se contaron a través de un Bioreader 4000 Pro X (BIOSYS). El sujeto control no proporciona ninguna señal significativa ($SI \geq 3$) contra ningún péptido, sino que mostró $SI = 22$ para un control positivo de toxina diftérica/toxoide del tétanos. Todos los pacientes ensayados, pero no el control, dieron respuestas significativas de IFN- γ ($SI \geq 3$) a al menos 3 péptidos, con el sujeto NO3 respondiendo a 12 de los grupos peptídicos. Se observó poca correlación entre los individuos, reconociéndose solo un conjunto de 17 (E5 + F5) en todos los sujetos.

Referencias

1. Wucherpfennig KW, Eisenbarth GS: Type 1 diabetes. Nat Immunol 2: 767-768, 2001
2. Yoon JW, Jun HS: Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. Ann N Y Acad Sci 928: 200-211, 2001
3. Rosmalen JG, van Ewijk W, Leenen PJ: T-cell education in autoimmune diabetes: teachers and students. Trends Immunol 23: 40-46, 2002
4. Rossini AA: Autoimmune diabetes and the circle of tolerance. Diabetes 53: 267-275, 2004
5. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclarek N: Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. J Clin Invest 109: 131-140, 2002
6. Arif S, Tree TI, Astill TP, Tremble JM, Bishop AJ, Dayan CM, Roep BO, Peakman M: Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. J Clin Invest 113: 451-463, 2004
7. Redondo MJ, Yu L, Hawa M, Mackenzie T, Pyke DA, Eisenbarth GS, Leslie RD: Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. Diabetologia 44: 354-362, 2001
8. Atkinson MA, Leiter EH: The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? Nat Med 5: 601-604, 1999
9. Andre I, Gonzalez A, Wang B, Katz J, Benoist C, Mathis D: Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 2260-2263, 1996
10. Kassem SA, Ariel I, Thornton PS, Scheimberg I, Glaser B: Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. Diabetes 49: 1325-1333, 2000
11. Rosmalen JG, Leenen PJ, Pelegri C, Drexhage HA, Homo-Delarche F: Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes. Trends Endocrinol Metab 13: 209-214, 2002
12. Ziegler AG, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E: Early infant feeding and risk of developing type 1

- diabetes-associated autoantibodies. *Jama* 290: 1721-1728, 2003
- 5 13. Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffman M, Eisenbarth GS, Erlich HA, Rewers M: Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *Jama* 290: 1713-1720, 2003
14. Hyoty H, Taylor KW: The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia* 45: 1353-1361, 2002
15. Larger E, Becourt C, Bach JF, Boitard C: Pancreatic islet beta cells drive T cell-immune responses in the nonobese diabetic mouse model. *J Exp Med* 181: 1635-1642, 1995
- 10 16. Baker FJ, Lee M, Chien YH, Davis MM: Restricted islet-cell reactive T cell repertoire of early pancreatic islet infiltrates in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9374-9379, 2002
17. Yang Y, Charlton B, Shimada A, Dal Canto R, Fathman CG: Monoclonal T cells identified in early NOD islet infiltrates. *Immunity* 4: 189-194, 1996
18. Tian J, Gregori S, Adorini L, Kaufman DL: The frequency of high avidity T cells determines the hierarchy of determinant spreading. *J Immunol* 166: 7144-7150, 2001
19. Amrani A, Verdaguer J, Serra P, Tafuro S, Tan R, Santamaria P: Progression of autoimmune diabetes driven by avidity maturation of a T-cell population. *Nature* 406: 739-742, 2000
- 15 20. Notkins AL, Lernmark A: Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J Clin Invest* 108: 1247-1252, 2001
21. Bowie L, Tite J, Cooke A: Generation and maintenance of autoantigen-specific CD8(+) T cell clones isolated from NOD mice. *J Immunol Methods* 228: 87-95, 1999
22. Haskins K, Portas M, Bergman B, Lafferty K, Bradley B: Pancreatic islet-specific T-cell clones from nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8000-8004, 1989
- 20 23. Nagata M, Santamaria P, Kawamura T, Utsugi T, Yoon JW: Evidence for the role of CD8+ cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic beta-cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 152: 2042-2050, 1994
24. Wegmann DR, Shehadeh N, Lafferty KJ, Norbury-Glaser M, Gill RG: Establishment of islet-specific T-cell lines and clones from islet isografts placed in spontaneously diabetic NOD mice. *J Autoimmun* 6: 517-527, 1993
- 25 25. Gelber C, Paborsky L, Singer S, McAteer D, Tisch R, Jolicoeur C, Buelow R, McDevitt H, Fathman CG: Isolation of nonobese diabetic mouse T-cells that recognize novel autoantigens involved in the early events of diabetes. *Diabetes* 43: 33-39, 1994
26. Castano L, Russo E, Zhou L, Lipes MA, Eisenbarth GS: Identification and cloning of a granule autoantigen (carboxypeptidase-H) associated with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 1197-1201., 1991
- 30 27. Martin S, Lampasona V, Dosch M, Pietropaolo M: Islet cell autoantigen 69 antibodies in IDDM. *Diabetologia* 39: 747, 1996
28. Buschard K, Josefson K, Horn T, Fredman P: Sulphatide and sulphatide antibodies in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 342: 840, 1993
- 35 29. Lieberman SM, Evans AM, Han B, Takaki T, Vinnitskaya Y, Caldwell JA, Serreze DV, Shabanowitz J, Hunt DF, Nathenson SG, Santamaria P, DiLorenzo TP: Identification of the {beta} cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+ T cells in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8384-8388, 2003
30. Eisenbarth GS, Moriyama H, Robles DT, Liu E, Yu L, Babu S, Redondo M, Gottlieb P, Wegmann D, Rewers M: Insulin autoimmunity: prediction/precipitation/prevention type 1A diabetes. *Autoimmun Rev* 1: 139-145, 2002
- 40 31. Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM: B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 161: 3912-3918, 1998
32. Kelemen K, Wegmann D, JC H: T cell epitope regions on phogrin and IA-2 in the NOD mouse. *Diabetologia* 43: A98, 2000
- 45 33. Wegmann DR, Norbury-Glaser M, Daniel D: Insulin-specific T cells are a predominant component of islet infiltrates in pre-diabetic NOD mice. *Eur J Immunol* 24: 1853-1857, 1994
34. Zekzer D, Wong FS, Ayalon O, Millet I, Altieri M, Shintani S, Solimena M, Sherwin RS: GAD-reactive CD4+ Th1 cells induce diabetes in NOD/SCID mice. *J Clin Invest* 101: 68-73, 1998
- 50 35. Wong FS, Karttunen J, Dumont C, Wen L, Visintin I, Pilip IM, Shastri N, Pamer EG, Janeway CA, Jr.: Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat Med* 5: 1026-1031, 1999
36. Daniel D, Gill RG, Schloot N, Wegmann D: Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. *Eur J Immunol* 25: 1056-1062, 1995
- 55 37. Chen W, Bergerot I, Elliott JF, Harrison LC, Abiru N, Eisenbarth GS, Delovitch TL: Evidence that a peptide spanning the B-C junction of proinsulin is an early Autoantigen epitope in the pathogenesis of type 1 diabetes. *J Immunol* 167: 4926-4935, 2001
38. Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, Babaya N, Liu E, Miao D, Yu L, Wegmann DR, Hutton JC, Elliott JF, Eisenbarth GS: Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 435: 220-223, 2005
- 60 39. DiLorenzo TP, Graser RT, Ono T, Christianson GJ, Chapman HD, Roopenian DC, Nathenson SG, Serreze DV: Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for all but the end stages of diabetes development in nonobese diabetic mice and use a prevalent T cell receptor alpha chain gene rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12538-12543., 1998
40. Trudeau JD, Kelly-Smith C, Verchere CB, Elliott JF, Dutz JP, Finegood DT, Santamaria P, Tan R: Prediction of spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice by quantification of autoreactive T cells in peripheral blood. *J Clin Invest* 111: 217-223, 2003
- 65 41. Herold KC: Achieving antigen-specific immune regulation. *J Clin Invest* 113: 346-349, 2004

42. Daniel D, Wegmann DR: Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23). *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 956-960, 1996
- 5 43. Wolfe T, Bot A, Hughes A, Mohrle U, Rodrigo E, Jaume JC, Baekkeskov S, von Herrath M: Endogenous expression levels of autoantigens influence success or failure of DNA immunizations to prevent type 1 diabetes: addition of IL-4 increases safety. *Eur J Immunol* 32: 113-121, 2002
- 10 44. Kaufman DL, Clare-Salzler M, Tian J, Forsthuber T, Ting GS, Robinson P, Atkinson MA, Sercarz EE, Tobin AJ, Lehmann PV: Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 366: 69-72, 1993
- 15 45. Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, McDevitt HO: Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 366: 72-75, 1993
- 20 46. Petersen JS, Karlsen AE, Markholst H, Worsaae A, Dyrberg T, Michelsen B: Neonatal tolerization with glutamic acid decarboxylase but not with bovine serum albumin delays the onset of diabetes in NOD mice. *Diabetes* 43: 1478-1484, 1994
- 25 47. Tian J, Clare-Salzler M, Herschenfeld A, Middleton B, Newman D, Mueller R, Arita S, Evans C, Atkinson MA, Mullen Y, Sarvetnick N, Tobin AJ, Lehmann PV, Kaufman DL: Modulating autoimmune responses to GAD inhibits disease progression and prolongs islet graft survival in diabetes-prone mice. *Nat Med* 2: 1348-1353, 1996
- 30 48. Ramiya VK, Shang XZ, Wasserfall CH, Maclaren NK: Effect of oral and intravenous insulin and glutamic acid decarboxylase in NOD mice. *Autoimmunity* 26: 139-151, 1997
- 35 49. Ablamunits V, Elias D, Cohen IR: The pathogenicity of islet-infiltrating lymphocytes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Clin Exp Immunol* 115: 260-267, 1999
- 40 50. Mukherjee R, Wagar D, Stephens TA, Lee-Chan E, Singh B: Identification of CD4+ T cell-specific epitopes of islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein: a novel beta cell autoantigen in type 1 diabetes. *J Immunol* 174: 5306-5315, 2005
- 45 51. Kelemen K, Wegmann DR, Hutton JC: T-cell epitope analysis on the autoantigen phogrin (IA-2beta) in the nonobese diabetic mouse. *Diabetes* 50: 1729-1734, 2001
- 50 52. Panagiotopoulos C, Qin H, Tan R, Verchere CB: Identification of a beta-cell-specific HLA class I restricted epitope in type 1 diabetes. *Diabetes* 52: 2647-2651, 2003
- 55 53. Van Vliet E, Roep BO, Meulenbroek L, Bruining GJ, De Vries RR: Human T cell clones with specificity for insulinoma cell antigens. *Eur J Immunol* 19: 213-216, 1989
- 60 54. Roep BO, Arden SD, de Vries RR, Hutton JC: T-cell clones from a type-1 diabetes patient respond to insulin secretory granule proteins. *Nature* 345: 632-634, 1990
- 65 55. Neophytou PI, Ozegbe P, Healey D, Quartey-Papafio R, Cooke A, Hutton JC: Development of a procedure for the direct cloning of T-cell epitopes using bacterial expression systems. *J Immunol Methods* 196: 63-72, 1996
- 70 56. Arden SD, Roep BO, Neophytou PI, Usac EF, Duinkerken G, de Vries RR, Hutton JC: Imogen 38: a novel 38-kD islet mitochondrial autoantigen recognized by T cells from a newly diagnosed type 1 diabetic patient. *J Clin Invest* 97: 551-561, 1996
- 75 57. 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* 8: 887-899, 1995
- 80 58. Benoist C, Mathis D: Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol* 2: 797-801, 2001
- 85 59. Atkinson MA, Bowman MA, Campbell L, Darrow BL, Kaufman DL, Maclaren NK: Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 94: 2125-2129, 1994
- 90 60. Roep BO, Hiemstra HS, Schloot NC, De Vries RR, Chaudhuri A, Behan PO, Drijfhout JW: Molecular mimicry in type 1 diabetes: immune cross-reactivity between islet autoantigen and human cytomegalovirus but not Coxsackie virus. *Ann N Y Acad Sci* 958: 163-165, 2002
- 95 61. Honeyman MC, Stone NL, Harrison LC: T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents. *Mol Med* 4: 231-239, 1998
- 100 62. Harkonen T, Lankinen H, Davydova B, Hovi T, Roivainen M: Enterovirus infection can induce immune responses that cross-react with beta-cell autoantigen tyrosine phosphatase IA-2/IAR. *J Med Virol* 66: 340-350, 2002
- 105 63. Rudy G, Stone N, Harrison LC, Colman PG, McNair P, Brusic V, French MB, Honeyman MC, Tait B, Lew AM: Similar peptides from two beta cell autoantigens, proinsulin and glutamic acid decarboxylase, stimulate T cells of individuals at risk for insulin-dependent diabetes. *Mol Med* 1: 625-633, 1995
- 110 64. Baekkeskov S, Nielsen JH, Marner B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark A: Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 298: 167-169, 1982
- 115 65. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P: Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347: 151-156, 1990
- 120 66. Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E: Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J Immunol* 155: 5419-5426, 1995
- 125 67. Cardozo AK, Heimberg H, Heremans Y, Leeman R, Kutlu B, Kruhoffer M, Orntoft T, Eizirik DL: A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 276: 48879-48886, 2001
- 130 68. Lilla V, Webb G, Rickenbach K, Maturana A, Steiner DF, Halban PA, Irminger JC: Differential gene

- expression in well-regulated and dysregulated pancreatic beta-cell (MIN6) sublines. *Endocrinology* 144: 1368-1379, 2003
- 5 69. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F: neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1607-1611,2000
70. Iizuka K, Miller B, Uyeda K: Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E358-364, 2006
- 10 71. Kash SF, Condie BG, Baekkeskov S: Glutamate decarboxylase and GABA in pancreatic islets: lessons from knock-out mice. *Horm Metab Res* 31: 340-344, 1999
72. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB: A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6062-6067, 2004
- 15 73. Malarkannan S, Mendoza LM, Shastri N: Generation of antigen-specific, lacZ-inducible T-cell hybrids. *Methods Mol Biol* 156: 265-272, 2001
74. Bednarek J, Furmaniak J, Wedlock N, Kiso Y, Baumann-Antczak A, Fowler S, Krishnan H, Craft JA, Rees Smith B: Steroid 21-hydroxylase is a major autoantigen involved in adult onset autoimmune Addison's disease. *FEBSLett* 309: 51-55, 1992
- 20 75. Mullins RJ, Cohen SB, Webb LM, Chernajovsky Y, Dayan CM, Londei M, Feldmann M: Identification of thyroid stimulating hormone receptor-specific T cells in Graves' disease thyroid using autoantigen-transfected Epstein-Barr virus-transformed B cell lines. *J Clin Invest* 96: 30-37, 1995
76. Kawasaki E, Eisenbarth GS, Wasmeier C, Hutton JC: Autoantibodies to protein tyrosine phosphatase-like proteins in type I diabetes. Overlapping specificities to phogrin and ICA512/IA-2. *Diabetes* 45: 1344-1349, 1996
- 25 77. Kawasaki E, Yu L, Rewers MJ, Hutton JC, Eisenbarth GS: Definition of multiple ICA512/phogrin autoantibody epitopes and detection of intramolecular epitope spreading in relatives of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 47: 733-742, 1998
78. Kelemen K, Gottlieb PA, Putnam AL, Davidson HW, Wegmann DR, Hutton JC: HLA-DQ8-associated T cell responses to the diabetes autoantigen phogrin (IA-2 beta) in human prediabetes. *J Immunol* 172: 3955-3962, 2004
- 30 79. Taneja V, David CS: HLA class II transgenic mice as models of human diseases. *Immunol Rev* 169: 67-79, 1999
80. Sonderstrup G, McDevitt H: Identification of autoantigen epitopes in MHC class II transgenic mice. *Immunol Rev* 164: 129-138, 1998
- 35 81. Inaba T, Koseki H, Suzuki M, Taniguchi M: Double-step and inverse polymerase chain reaction for sensitive detection and cloning of T cell receptor variable region sequences. *Int Immunol* 3: 1053-1057, 1991
82. Abraham RS, Wen L, Marietta EV, David CS: Type 1 diabetes-predisposing MHC alleles influence the selection of glutamic acid decarboxylase (GAD) 65-specific T cells in a transgenic model. *J Immunol* 166: 13 70-1379, 2001
- 40 83. Abraham RS, Kudva YC, Wilson SB, Strominger JL, David CS: Co-expression of HLA DR3 and DQ8 results in the development of spontaneous insulitis and loss of tolerance to GAD65 in transgenic mice. *Diabetes* 49: 548-554, 2000
84. Christianson SW, Shultz LD, Leiter EH: Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes* 42: 44-55, 1993
- 45 85. Wong FS, Visintin I, Wen L, Flavell RA, Janeway CA, Jr.: CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J Exp Med* 183: 67-76, 1996
86. Wang B, Gonzalez A, Benoist C, Mathis D: The role of CD8+ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 26: 1762-1769, 1996
- 50 87. Amrani A, Verdaguer J, Anderson B, Utsugi T, Bou S, Santamaria P: Perforin-independent beta-cell destruction by diabetogenic CD8(+) T lymphocytes in transgenic nonobese diabetic mice. *J Clin Invest* 103: 1201-1209, 1999
88. Graser RT, DiLorenzo TP, Wang F, Christianson GJ, Chapman HD, Roopenian DC, Nathenson SG, Serreze DV: Identification of a CD8 T cell that can independently mediate autoimmune diabetes development in the complete absence of CD4 T cell helper functions. *J Immunol* 164: 3913-3918., 2000
- 55 89. Haskins K, McDuffie M: Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone. *Science* 249: 1433-1436, 1990
90. Takaki T, Marron MP, Mathews CE, Guttmann ST, Bottino R, Trucco M, DiLorenzo TP, Serreze DV: HLA-A*0201-restricted T cells from humanized NOD mice recognize autoantigens of potential clinical relevance to type 1 diabetes. *J Immunol* 176: 3257-3265, 2006

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Regent of the University of Colorado Hutton, John Wenzlau, Jan Jensen, Jan Davidson, Howard
 5 <120> Diana diagnóstica y terapéutica para enfermedades autoinmunitarias y sus usos
 <130> 2848-94-PCT
 10 <150> 60/882.815
 <151> 29-12-2006
 <160> 67
 15 <170> Patent In versión 3.4
 <210> 1
 <211> 5373
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 20 <220>
 <221> CDS
 <222> (231)..(1340)
 25 <400> 1

accagttttt gt aggt gaaa acaat gaagc caggt aat at tgcaaggagg ct gt aat ttt agcagaccta ccaacaacac t gat gl agga agct catt at tttaatttct ggagcc ttt aat ttttct ttagaaagt g tataaat aat tgcagt gct g ctttgc tcc aaaact gggc agtgagttca acaacaacga caacaacagc cgca gct cat cctggccgtc atg gag Met Glu 1	60 120 180 236
ttt cit gaa aga acg tat cit gtg aat gat aaa gct gcc aag aig tat Phe Leu Gu Arg Thr Tyr Leu Val Asn Asp Lys Ala Ala Lys Met Tyr 5 10 15	284
gct ttc aca cta gaa agt gtg gaa ctc caa cag aaa ccg gtg aat aaa Ala Phe Thr Leu Gu Ser Val Gu Leu Gl n Gl n Lys Pro Val Asn Lys 20 25 30	332
gat cag tgt ccc aga gag aga cca gag gag ctg gag tca gga ggc atg Asp Gl n Oys Pro Arg Gl u Arg Pro Gl u Gl u Leu Gu Ser Gl y Gl y Met 35 40 45 50	380
tac cac tgc cac agt ggc tcc aag ccc aca gaa aag ggg gcg aat gag Tyr His Oys His Ser Gl y Ser Lys Pro Thr Gl u Lys Gl y Ala Asn Gl u 55 60 65	428
tac gcc tat gcc aag tgg aaa ctc tgt tct gct tca gca at a tgc ttc Tyr Ala Tyr Ala Lys Trp Lys Leu Oys Ser Ala Ser Ala Ile Oys Phe 70 75 80	476
att ttc atg att gca gag gtc gtg ggt ggg cac att gct ggg agt ct t lle Phe Met lle Ala Gu Val Val Gl y Gl y His lle Ala Gl y Ser Leu 85 90 95	524
gct gtt gtc aca gal gct gcc cac ctc tta att gac ctg acc agt ttc Ala Val Val Thr Asp Ala Ala His Leu Leu lle Asp Leu Thr Ser Phe 100 105 110	572

ES 2 533 566 T3

ctg ctc agt ctc ttc tcc ctg tgg ttg tca tcg aag cct ccc tct aag Leu Leu Ser Leu Phe Ser Leu Trp Leu Ser Ser Lys Pro Pro Ser Lys 115 120 125 130	620
cgg ctg aca ttt gga tgg cac cga gca gag atc ctt ggt gcc ctg ctc Arg Leu Thr Phe Gly Trp His Arg Ala Glu Ile Leu Gly Ala Leu Leu 135 140 145	668
tcc atc ctg tgc atc tgg gtg gtg act ggc gtg cta gtg tac ctg gca Ser Ile Leu Cys Ile Trp Val Val Thr Gly Val Leu Val Tyr Leu Ala 150 155 160	716
tgt gag cgc ctg ctg tat cct gat tac cag atc cag gcg act gtg atg Cys Glu Arg Leu Leu Tyr Pro Asp Tyr Gln Ile Gln Ala Thr Val Met 165 170 175	764
atc atc gtt tcc agc tgc gca glg gcg gcc aac att gta cta act gtg Ile Ile Val Ser Ser Oys Ala Val Ala Ala Asn Ile Val Leu Thr Val 180 185 190	812
gtt ttg cac cag aga tgc ctt ggc cac aat cac aag gaa gta caa gcc Val Leu His Gln Arg Oys Leu Gly His Asn His Lys Glu Val Gln Ala 195 200 205 210	860
aat gcc agc gtc aga gct gct ttt gtg cat gcc ctt gga gat cta ttt Asn Ala Ser Val Arg Ala Ala Phe Val His Ala Leu Gly Asp Leu Phe 215 220 225	908
cag agt atc agt gtg cta att agt gca ctt att atc tac ttt aag cca Gln Ser Ile Ser Val Leu Ile Ser Ala Leu Ile Tyr Phe Lys Pro 230 235 240	956
gag tat aaa ata gcc gac cca atc tgc aca ttc atc ttt tcc atc ctg Glu Tyr Lys Ile Ala Asp Pro Ile Cys Thr Phe Ile Phe Ser Ile Leu 245 250 255	1004
gtc ttg gcc agc acc atc act atc tta aag gac ttc tcc atc tta ctc Val Leu Ala Ser Thr Ile Thr Ile Leu Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu 260 265 270	1052
atg gaa ggt gtg cca aag agc ctg aat tac agt ggt gtg aaa gag ctt Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu 275 280 285 290	1100
att tta gca gtc gac ggg gtg ctg tct gtg cac agc ctg cac atc tgg Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu Ser Val His Ser Leu His Ile Trp 295 300 305	1148
tct cta aca atg aat caa gta att ctc tca gct cat gtt gct aca gca Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala 310 315 320	1196
gcc agc cgg gac agc caa gtg gtt cggt aga gaa att gct aaa gcc ctt Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val Arg Arg Gln Ile Ala Lys Ala Leu 325 330 335	1244
agc aaa agc ttt acg atg cac tca ctc acc att cag atg gaa tct cca Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro 340 345 350	1292
gtt gag cag gac ccc gac tgc ctt ttc tgt gaa gac ccc tgt gac tag Val Asp Gln Asp Pro Asp Oys Leu Phe Oys Glu Asp Pro Oys Asp 355 360 365	1340
ctcagt caca ccgt cag ttt cccaaat ttt acaggccacc ttcaaacatg ctgt at gca gtt tttcat cat agaaaat aagaaccaa aggaagaaat tcatgtcatg gtgtcaat gca cat tttatct atttttag tccattcac cat gaaggaa gaggtactga galccatcaa	1400 1460 1520

tcaattggat	tatataciga	tcagtagctg	tgttcaattg	caggaatgtg	tatataaggat	1580
atccctgagt	ggagccgaaag	taacagctgt	ttgtiaactat	cggcaatacc	aaatctatct	1640
cccttccaat	aatgcattt	gagaacacat	aggtaaatii	gaactcagga	aagtcttact	1700
agaaaatcagt	ggaagggaca	aatagtaca	aaatttacc	aaaacattag	aaacaaaaaa	1760
taaggagagc	caagtcagga	ataaaagtga	ctctgtatgc	taacgccaca	ttagaacttg	1820
gttctctcac	caagctgtaa	tgtgatttt	ttttctactc	tgaattggaa	atatgtatga	1880
atatacagag	aagtgcitac	aactaatttt	tatitacttg	tcacattttg	gcaataaatc	1940
cctcttattt	ctaaatttctt	acttgtttat	ttcaaaactt	tatataatca	ctgttcaaaa	2000
ggaaaatattt	tcacccatcca	gagtgcitaa	acactggcac	cagccaaaga	atgtggtgtl	2060
agagaccagg	aagtcctcaa	gaacagccga	caaaaacatt	cgagttgacc	ccaccaagt	2120
gttgcacacag	ataatttaga	tatitaccig	caagaaggaa	taaagcagat	gcaaccaatt	2180
cattcagtcc	acgagcatga	tgtgagca	gttttgcgt	agacattggg	cttagcattg	2240
aaactataaa	gaggaatcag	acgcagcaag	tgcttcgttg	ttctgttagc	aactcaacac	2300
tatctgttga	gagttaactg	aagatgtgca	ggccaaacatt	ctggaaaicc	tatgtcaatg	2360
ggtttggttt	ggaaccttgg	cttcgtattt	tttaaaagt	acccagagat	gtttctaaag	2420
atgagccata	gtctagaaga	ttgtcaacca	caggatctca	ttagtggg	cagctagaca	2480
catacatgg	cagctacaat	agtatcatga	atlgcaalga	tgtagtggg	tataaaagga	2540
aagcgatgga	tatgtccgga	tggcatggc	cagtgttgtt	tacgttattt	gagggtacag	2600
ctctgttga	ctttgaattt	catatggagg	ctctccagga	agacgaagaa	gagaaggaca	2660
ttctaggcaa	aaagaagact	aggcacaagg	cacactttag	tttgttctgtt	agcttttagt	2720
tgaaaaagca	aaatacatga	tgc当地gaaa	ctctccacg	ctgtgttttt	taaaactaca	2780
tacccccgc	aactttatgg	ttatgat	tgtagagaac	aggagatagg	tctttagatga	2840
ttttttagt	gttgtcagac	tctagcaagg	tactagaaac	ctacaggca	ttataattt	2900
ttgaggcaat	gactctgagg	ctatatctgg	gccttgcatt	tatattat	ttatatttgt	2960
attttttct	gaaattttag	ggccaagaaa	acattgacit	tgactgagga	ggtcacatct	3020
gtgcccattt	tgc当地caa	ttagcaccac	tgaaatact	acttagcatt	ctgtctgagct	3080
ttccctgtct	agttagagaca	aatatactca	tcccccacct	cagttagctt	gtttaggcaa	3140
ccaggattag	agctgtcag	gttcccaacg	tctctgtccca	catcgggttc	tcaaaatgga	3200
aagaatggt	tatgc当地at	cacttttctt	gtctgaagga	ccactgaatg	gttttgtttt	3260
tccatattt	gcataggacg	ccctaaagac	taggtgactt	ggcaaacaca	caagtgttag	3320
tataattctt	tgtttctgt	tctttttagaa	aatcatgtt	agatttgatt	ttaagttaga	3380
aatttactga	atgtcaggta	atcatatgg	aggagattt	gtgtgtcaac	caaagtatt	3440
gtcccaatggc	cccaaggat	ttctgttgtt	tccctgaaat	tctgtttttt	tagttagctt	3500
gattgaaaac	tctgaacagt	agatgtttat	atggcaaaat	gcaagacaat	ctacaaggga	3560

<210> 2
<211> 369
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 533 566 T3

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

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

Asn Glu Tyr Ala Tyr Ala Lys Trp Lys Leu Oys 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 Oys Ile Trp Val Val Thr Gly Val Leu Val Tyr
 145 150 155 160

Leu Ala Oys 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 Oys 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 Oys 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

ES 2 533 566 T3

Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu Asn Tyr Ser Glu 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 Oys Leu Phe Oys Glu Asp Pro Oys
355 360 365

Asp

<210> 3

<211> 1906

5 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

10 <222> (334)..(1437)

<400> 3

atgtgcgcgc acgcgcgcgc gcacacacac acacacacac acacacacac acacacacac	60
acacttatta caattgtacc tttagtctc ccagaaaagc agtttgtg agtgatagaa	120
ttagtctagg tggatttcca aggagactgt taatttcac agatttaccc acaacactga	180
tataggaggc ctcattaact caagtactgg aagaatttt ctaattttt aggaagtgt	240
gtgaatataa taatatcgt gcttcttac ttccaaaact ggacagcgca tcaaacatca	300
gaaacaacag tatcagctcc tgccttact acc atg gag ttt ctt gag aga act	354
Met Glu Phe Leu Glu Arg Thr	
1 5	
tat ctt gtg aat gat caa gcc acc aag atg tac gcc ttc cct cta gac	402
Tyr Leu Val Asn Asp Gln Ala Thr Lys Met Tyr Ala Phe Pro Leu Asp	
10 15 20	
aga gaa ctt cga cag aag cct gtg aat aaa gat cag tgt cct gga gac	450
Arg Glu Leu Arg Gln Lys Pro Val Asn Lys Asp Gln Oys Pro Glu Asp	
25 30 35	
agg cca gag cat cca gag gca gga ggc atc tat cac tgc cac aac agc	498
Arg Pro Glu His Pro Glu Ala Glu Ile Tyr His Oys His Asn Ser	
40 45 50 55	
gcc aag gcc aca ggg aac agg tcg agc aag caa gcg cat gcc aag tgg	546
Ala Lys Ala Thr Glu Asn Arg Ser Ser Lys Gln Ala His Ala Lys Trp	
60 65 70	

ES 2 533 566 T3

aga ctc tgt gct gct tca gca at a tgc tt c a c ttt at g gt g gca gag	594
Arg Leu Cys Ala Ala Ser Ala Ile Cys Phe Ile Phe Met Val Ala Glu	
75 80 85	
gt g gt g ggt gga cac gtt gct ggg agt ctg gct atc ctc act gat gcg	642
Val Val Gly Gly His Val Ala Gly Ser Leu Ala Ile Leu Thr Asp Ala	
90 95 100	
gct cat ctc tta att gac ctg act agt ttc ctg ctc agt ctc ttt tct	690
Ala His Leu Leu Ile Asp Leu Thr Ser Phe Leu Leu Ser Leu Phe Ser	
105 110 115	
ttg tgg ttg tca tcg agg ccc cct tcc aag cgg ctg aca ttt ggg tgg	738
Leu Trp Leu Ser Ser Arg Pro Pro Ser Lys Arg Leu Thr Phe Gly Trp	
120 125 130 135	
tat cga gca gag atc ctc ggt gcc ctg ctg tct gtc ctt tgc atc tgg	786
Tyr Arg Ala Glu Ile Leu Gly Ala Leu Leu Ser Val Leu Oys Ile Trp	
140 145 150	
gt g gt g act ggt gt g ctg ctg tac ctt gcc ttt gat cgc ctt ttt tat	834
Val Val Thr Gly Val Leu Leu Tyr Leu Ala Oys Glu Arg Leu Leu Tyr	
155 160 165	
cct gat tac cag aic caa gca ggt atc atg atc act gtt tca ggc ttt	882
Pro Asp Tyr Gln Ile Gln Ala Gly Ile Met Ile Thr Val Ser Gly Cys	
170 175 180	
gca gt g gca gcc aac att gta cta act atg att ttt cac caa cgg aac	930
Ala Val Ala Ala Asn Ile Val Leu Thr Met Ile Leu His Gln Arg Asn	
185 190 195	
ttt ggc tac aac cac aag gat gta caa gct aat gcc agt gtc cga gca	978
Phe Gly Tyr Asn His Lys Asp Val Gln Ala Asn Ala Ser Val Arg Ala	
200 205 210 215	
gcc ttt gt g cat gcc ctg ggg gat gta ttt cag agc atc agt gt g cta	1026
Ala Phe Val His Ala Leu Gly Asp Val Phe Gln Ser Ile Ser Val Leu	
220 225 230	
att agt gct ctc att atc tac ttt aag cct gac tac aaa att gct gat	1074
Ile Ser Ala Leu Ile Ile Tyr Phe Lys Pro Asp Tyr Lys Ile Ala Asp	
235 240 245	
cca gtc tgc aca ttt atc ttt tcc atc ctg gtt ttt gcc agc acc gtc	1122
Pro Val Oys Thr Phe Ile Phe Ser Ile Leu Val Leu Ala Ser Thr Val	
250 255 260	
atg atc tta aaa gac ttc tcc atc tta ctc atg gaa ggt gtt cca aag	1170
Met Ile Leu Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys	
265 270 275	
ggc ctg agt tac aac agt gt g aaa gag atc atc ctc gca gtt gat ggc	1218
Gly Leu Ser Tyr Asn Ser Val Lys Glu Ile Ile Leu Ala Val Asp Gly	
280 285 290 295	
gt g aic tcc gt g cac agt cta cac atc tgg tca ctg act gt g aac caa	1266
Val Ile Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Val Asn Gln	
300 305 310	
gt g att ctc tct gtt cat gtt gct aca gct gcc agc cag gac agc cag	1314
Val Ile Leu Ser Val His Val Ala Thr Ala Ala Ser Gln Asp Ser Gln	
315 320 325	
tct gt g cg gca gga att gct caa gcc ctc agc agc ttt gat ctt cac	1362
Ser Val Arg Thr Gly Ile Ala Gln Ala Leu Ser Ser Phe Asp Leu His	
330 335 340	
tct ctt acc att cag ata gaa tct gca gca gac cag gac ccc agc tgc	1410

Ser	Leu	Thr	Ile	Gln	Ile	Glu	Ser	Ala	Ala	Asp	Gln	Asp	Pro	Ser	Cys							
345						350					355											
ctt	ctc	tgc	gaa	gac	cct	cag	gac	tag	ctcggt	caca	ctgt	cagctt			1457							
Leu	Leu	Oys	Gu	Asp	Pro	Gu	Asp															
360						365																
cct	gt	gtt	tc	taaggccatg	at	aaga	tgca	gca	aat	gaggcag					1517							
ccgt	cgga	at	gat	tt	gaga	aagt	cat	gt	gat	gcacactt	cctt	gtt	att		1577							
tat	ct	ct	at	c	caccat	gaac	gaggat	gtc	gggat	tt	gg	tt	at	at	acat	1637						
aat	cagt	agt	tgt	gt	caat	tgca	tat	at	at	agat	tt	cc	taact	gga	gt	gaaataa	1697					
cagat	gtt	tg	caat	cat	agg	taat	gaat	gt	tt	caact	tt	gcc	tacaat	agt	g	ggt	at	agt	tt	1757		
tact	cg	gaaa	tg	cc	ttt	ct	a	gga	tt	caat	cc	ttt	ttt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	1817	
gaggc	tt	ag	aat	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	1877
gt	aaa	act	tt	tc	ttt	tg	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	1906

<210> 4

<211> 367

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 4

Met	Gu	Phe	Leu	Gl	u	Arg	Thr	Tyr	Leu	Val	Asn	Asp	Gln	Ala	Thr	Lys
1				5						10					15	
Met	Tyr	Ala	Phe	Pro	Leu	Asp	Arg	Gl	u	Leu	Arg	Gln	Lys	Pro	Val	Asn
					20			25					30			
Lys	Asp	Gln	Oys	Pro	Gly	Asp	Arg	Pro	Gu	His	Pro	Gu	Ala	Gly	Gly	
					35			40					45			
Ile	Tyr	His	Oys	His	Asn	Ser	Ala	Lys	Ala	Thr	Gly	Asn	Arg	Ser	Ser	
					50			55			60					
Lys	Gn	Ala	His	Ala	Lys	Trp	Arg	Leu	Oys	Ala	Ala	Ser	Ala	Ile	Oys	
					65			70			75				80	
Phe	Ile	Phe	Met	Val	Ala	Gu	Val	Val	Gly	Gly	His	Val	Ala	Gly	Ser	
					85			90			95					
Leu	Ala	Ile	Leu	Thr	Asp	Ala	Ala	His	Leu	Leu	Ile	Asp	Leu	Thr	Ser	
					100			105			110					
Phe	Leu	Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Leu	Trp	Leu	Ser	Ser	Arg	Pro	Pro	Ser	
					115			120			125					
Lys	Arg	Leu	Thr	Phe	Gly	Trp	Tyr	Arg	Ala	Gu	Ile	Leu	Gly	Ala	Leu	
					130			135			140					
Leu	Ser	Val	Leu	Oys	Ile	Trp	Val	Val	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Tyr	Leu	
					145			150			155				160	

ES 2 533 566 T3

Ala Cys Glu Arg Leu Leu Tyr Pro Asp Tyr Gln Ile Gln Ala Gly Ile
 165 170 175
 Met Ile Thr Val Ser Gly Cys Ala Val Ala Ala Asn Ile Val Leu Thr
 180 185 190
 Met Ile Leu His Gln Arg Asn Phe Gly Tyr Asn His Lys Asp Val Gln
 195 200 205
 Ala Asn Ala Ser Val Arg Ala Ala Phe Val His Ala Leu Gly Asp Val
 210 215 220
 Phe Gln Ser Ile Ser Val Leu Ile Ser Ala Leu Ile Ile Tyr Phe Lys
 225 230 235 240
 Pro Asp Tyr Lys Ile Ala Asp Pro Val Cys Thr Phe Ile Phe Ser Ile
 245 250 255
 Leu Val Leu Ala Ser Thr Val Met Ile Leu Lys Asp Phe Ser Ile Leu
 260 265 270
 Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Gln Leu Ser Tyr Asn Ser Val Lys Glu
 275 280 285
 Ile Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Ile Ser Val His Ser Leu His Ile
 290 295 300
 Trp Ser Leu Thr Val Asn Gln Val Ile Leu Ser Val His Val Ala Thr
 305 310 315 320
 Ala Ala Ser Gln Asp Ser Gln Ser Val Arg Thr Gly Ile Ala Gln Ala
 325 330 335
 Leu Ser Ser Phe Asp Leu His Ser Leu Thr Ile Gln Ile Glu Ser Ala
 340 345 350
 Ala Asp Gln Asp Pro Ser Cys Leu Leu Oys Glu Asp Pro Gln Asp
 355 360 365

<210> 5

<211> 320

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Met Tyr His Oys His Ser Gly Ser Lys Pro Thr Glu Lys Gly Ala Asn
 1 5 10 15
 Glu Tyr Ala Tyr Ala Lys Trp Lys Leu Oys Ser Ala Ser Ala Ile Oys
 20 25 30

ES 2 533 566 T3

Phe Ile Phe Met Ile Ala Glu Val Val Gly Gly His Ile Ala Gly Ser
 35 40 45
 Leu Ala Val Val Thr Asp Ala Ala His Leu Leu Ile Asp Leu Thr Ser
 50 55 60
 Phe Leu Leu Ser Leu Phe Ser Leu Trp Leu Ser Ser Lys Pro Pro Ser
 65 70 75 80
 Lys Arg Leu Thr Phe Gly Trp His Arg Ala Glu Ile Leu Gly Ala Leu
 85 90 95
 Leu Ser Ile Leu Cys Ile Trp Val Val Thr Gly Val Leu Val Tyr Leu
 100 105 110
 Ala Cys Glu Arg Leu Leu Tyr Pro Asp Tyr Gln Ile Gln Ala Thr Val
 115 120 125
 Met Ile Ile Val Ser Ser Cys Ala Val Ala Ala Asn Ile Val Leu Thr
 130 135 140
 Val Val Leu His Gln Arg Cys Leu Gly His Asn His Lys Glu Val Gln
 145 150 155 160
 Ala Asn Ala Ser Val Arg Ala Ala Phe Val His Ala Leu Gly Asp Leu
 165 170 175
 Phe Gln Ser Ile Ser Val Leu Ile Ser Ala Leu Ile Ile Tyr Phe Lys
 180 185 190
 Pro Glu Tyr Lys Ile Ala Asp Pro Ile Cys Thr Phe Ile Phe Ser Ile
 195 200 205
 Leu Val Leu Ala Ser Thr Ile Thr Ile Leu Lys Asp Phe Ser Ile Leu
 210 215 220
 Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu
 225 230 235 240
 Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu Ser Val His Ser Leu His Ile
 245 250 255
 Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile Leu Ser Ala His Val Ala Thr
 260 265 270
 Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val Arg Arg Gln Ile Ala Lys Ala
 275 280 285
 Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser
 290 295 300
 Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu Phe Cys Glu Asp Pro Cys Asp

305 310 315 320

ES 2 533 566 T3

<210> 6
<211> 28
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5
<400> 6

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

Met Tyr Ala Phe Thr Leu Glu Arg Arg Ser Cys Lys
20 25

10 <210> 7
<211> 28
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 7

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

Met Tyr Ala Phe Thr Leu Glu Arg Arg Ser Arg Lys
20 25

20 <210> 8
<211> 74
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 8

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

Met Tyr 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
65 70

30 <210> 9
<211> 103
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu
1 5 10 15

ES 2 533 566 T3

Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu
20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile
35 40 45

Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val
50 55 60

Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser
65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Oys Leu
85 90 95

Phe Oys Glu Asp Pro Oys Asp
100

<210> 10

<211> 87

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu
1 5 10 15

Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu
20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile
35 40 45

Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val
50 55 60

Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser
65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser
85

10 <210> 11

<211> 78

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu
1 5 10 15

Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu

ES 2 533 566 T3

20

25

30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val
 50 55 60

Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met
 65 70 75

<210> 12

<211> 103

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu
 1 5 10 15

Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu
 20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val
 50 55 60

Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Ala Ser Phe Thr Met Ala Ser
 65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Met Ala Ala Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Oys Leu
 85 90 95

Phe Oys Glu Asp Pro Oys Asp
 100

10

<210> 13

<211> 26

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

Val Leu Thr Val Val Leu His Gln Arg Oys Leu Gly His Asn His Lys
 1 5 10 15

Glu Val Gln Ala Asn Ala Ser Val Arg Ala
 20 25

20

<210> 14

<211> 95

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

ES 2 533 566 T3

Met G u G y Val Pro Lys Ser Leu Asn Tyr Ser G y Val Lys G u Leu
 1 5 10 15

Ile Leu Ala Val Asp G y Val Leu Ser Val His Ser Leu His Ile Trp
 20 25 30

Ser Leu Thr Met Asn G n Val Ile Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala
 35 40 45

Ala Ser Arg Asp Ser G n Val Val Arg Arg G u Ile Ala Lys Ala Leu
 50 55 60

Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser Leu Thr Ile G n Met G u Ser Pro
 65 70 75 80

Val Asp G n Asp Pro Asp Cys Leu Phe Cys G u Asp Pro Cys Asp
 85 90 95

<210> 15

<211> 88

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Met Asn Tyr Ser G y Val Lys G u Leu Ile Leu Ala Val Asp G y Val
 1 5 10 15

Leu Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn G n Val
 20 25 30

Ile Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser G n Val
 35 40 45

Val Arg Arg G u Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His
 50 55 60

Ser Leu Thr Ile G n Met G u Ser Pro Val Asp G n Asp Pro Asp Cys
 65 70 75 80

Leu Phe Cys G u Asp Pro Cys Asp
 85

10

<210> 16

<211> 80

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

Met Ile Leu Ala Val Asp G y Val Leu Ser Val His Ser Leu His Ile
 1 5 10 15

ES 2 533 566 T3

Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile Leu Ser Ala His Val Ala Thr
20 25 30

Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala
35 40 45

Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser
50 55 60

Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu Phe Cys Glu Asp Pro Cys Asp
65 70 75 80

<210> 17

<211> 70

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Met His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile Leu
1 5 10 15

Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val Arg
20 25 30

Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser Leu
35 40 45

Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu Phe
50 55 60

Cys Glu Asp Pro Cys Asp
65 70

10

<210> 18

<211> 65

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

Met Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile Leu Ser Ala His Val Ala
1 5 10 15

Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val Arg Arg Glu Ile Ala Lys
20 25 30

Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu
35 40 45

Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu Phe Cys Glu Asp Pro Cys
50 55 60

Asp
65

20

<210> 19

<211> 26

ES 2 533 566 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

5

Met Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu Asn
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala
20 25

<210> 20

<211> 57

10

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Met Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu Asn
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu Ser
20 25 30

Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile Leu
35 40 45

Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser
50 55

15

<210> 21

<211> 76

20

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

Met Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu Asn
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu Ser
20 25 30

Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile Leu
35 40 45

Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val Arg
50 55 60

Arg Gua Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr
65 70 75

25

<210> 22

<211> 102

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 22

ES 2 533 566 T3

Met Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu Asn
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu Ser
20 25 30

Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile Leu
35 40 45

Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val Arg
50 55 60

Arg Gu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser Leu
65 70 75 80

Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Oys Leu Phe
85 90 95

Oys Glu Asp Pro Oys Asp
100

<210> 23

<211> 89

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

Met Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu Asn
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu Ser
20 25 30

Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile Leu
35 40 45

Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val Arg
50 55 60

Arg Gu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser Leu
65 70 75 80

Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp
85

10

<210> 24

<211> 102

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 24

ES 2 533 566 T3

Met Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu Asn
 1 5 10 15

Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu Ser
 20 25 30

Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile Leu
 35 40 45

Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val Arg
 50 55 60

Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser Leu
 65 70 75 80

Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu Phe
 85 90 95

Cys Glu Asp Pro Cys Asp
 100

<210> 25

<211> 103

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

5

<400> 25

Arg Asp Val Leu Leu Val Leu Met Glu Gly Ala Pro Arg Ser Val Glu
 1 5 10 15

Phe Glu Pro Val Arg Asp Thr Leu Leu Ser Val Pro Gly Val Arg Ala
 20 25 30

Thr His Asp Leu His Leu Trp Ala Leu Thr Leu Thr Tyr His Val Ala
 35 40 45

Ser Ala His Leu Ala Ile Asp Ser Thr Ala Asp Pro Glu Ala Val Leu
 50 55 60

Ala Glu Ala Ser Ser Arg Leu Tyr Ser Arg Phe Gly Phe Ser Ser Cys
 65 70 75 80

Thr Leu Gln Val Glu Gln Tyr Gln Pro Glu Met Ala Gln Cys Leu Arg
 85 90 95

Cys Gln Glu Pro Ser Gln Ala
 100

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> *Macaca mulatta*

15

<400> 26

ES 2 533 566 T3

Phe Thr Val Tyr Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln
1 5 10 15

Asp

<210> 27

<211> 17

5 <212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 27

Tyr Thr Val His Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Ala Asp Gln
1 5 10 15

Asp

10

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

15 <213> *Rattus rattus*

<400> 28

Phe Asp Leu His Ser Leu Thr Ile Gln Ile Glu Ser Ala Ala Asp Gln
1 5 10 15

Asp

20

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

25 <213> *Bos taurus*

<400> 29

Phe Pro Val His Ser Leu Thr Ile Gln Met Ser Cys Ser Pro Thr Arg
1 5 10 15

Ile

30

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> *Xenopus* sp.

35

<400> 30

Phe Pro Phe His Ser Val Thr Ile Gln Val Glu Pro Ile Glu Asp Gln
1 5 10 15

Ser

40

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

ES 2 533 566 T3

<400> 31

Tyr Ser Phe His Ser Ile Thr Ile Gln Ile Gln Ser Gly Gly Asp Gln
1 5 10 15

Glu

5 <210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> *Danio rerio*

10 <400> 32

Tyr Ser Phe His Ser Val Thr Ile Gln Leu Glu Pro Gln Ala Asp Gln
1 5 10 15

Arg

15 <210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 33

Phe His Phe His Thr Val Thr Ile Gln Ile Glu Asp Tyr Ser Glu Asp
1 5 10 15

Met

25 <210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

Phe Gly Phe Ser Ser Cys Thr Leu Gln Val Glu Gln Tyr Gln Pro Glu
1 5 10 15

30 Met

35 <210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> *Pyrococcus* sp.

<400> 35

Phe Gly Ile Thr His Val Thr Ile Gln Leu Glu Thr Gly Arg Cys Lys

1

5

10

15

Glu

40 <210> 36

ES 2 533 566 T3

<211> 17
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

5 <400> 36

Val Asp Gly Asn Gln Ile Thr Ile Gln Met Glu Ser Lys Ile Asp Val
1 5 10 15

Gln

10 <210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 37

Ser Met His Asp Leu Thr Thr Ile Gln Gly Asp Glu Pro Val Gly Gln
1 5 10 15

Arg

20 <210> 38
<211> 69
<212> PRT
<213> *Xenopus* sp.

<400> 38

Met Lys Gly Ser Glu Glu Ala Tyr Leu Val Ser Asp Lys Ala Thr Lys
1 5 10 15

Met Tyr Ser Leu Thr Lys Asp Ser Glu Lys Asn His Pro Ser Lys Pro
20 25 30

Pro Leu Gln Asp Glu Glu Asn Pro Gln Ser Lys Tyr His Cys His Asn
35 40 45

Asn Asn Lys Lys Ala Tyr Asp Ala Arg Gln Arg Glu Gln Thr Phe Ala
50 55 60

25 Lys Lys Lys Leu Cys
65

<210> 39
<211> 102
<212> PRT
30 <213> *Xenopus* sp.

<400> 39

ES 2 533 566 T3

Arg Asp Leu Leu Thr Val Leu Met Glu G y Thr Arg Pro G y Ile His
 1 5 10 15

Tyr Ser Asp Val Lys G n Ser Ile Leu Ala Val Asp G y Val Lys Ser
 20 25 30

Val His Ser Leu His Leu Trp Ala Leu Thr Met Asn G n Val Ile Leu
 35 40 45

Ser Ala His Ile Ala Thr Asp Ile Val G y G u Ser Lys Arg Ile Leu
 50 55 60

Lys Asp Val Thr G n Asn Val Phe Ala Arg Phe Pro Phe His Ser Val
 65 70 75 80

Thr Ile G n Val G u Pro Ile G u Asp G n Ser Pro G u Cys Met Phe
 85 90 95

Cys Tyr G u Pro Thr G n
 100

<210> 40

<211> 102

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 40

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met G u G y Val Pro Lys G y Leu
 1 5 10 15

Ser Tyr Asn Ser Val Lys G u Ile Ile Leu Ala Val Asp G y Val Ile
 20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Val Asn G n Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Val His Val Ala Thr Ala Ala Ser G n Asp Ser G n Ser Val
 50 55 60

Arg Thr G y Ile Ala G n Ala Leu Ser Ser Phe Asp Leu His Ser Leu
 65 70 75 80

Thr Ile G n Ile G u Ser Ala Ala Asp G n Asp Pro Ser Cys Leu Leu
 85 90 95

Cys G u Asp Pro G n Asp
 100

10

<210> 41

<211> 102

15 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 41

ES 2 533 566 T3

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Gly Leu
 1 5 10 15

Ser Tyr Asn Ser Val Lys Glu Ile Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Ile
 20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Val Asn Gln Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Val His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Ser Val
 50 55 60

Arg Thr Gly Ile Ala Gln Ala Leu Ser Ser Phe Asp Leu His Ser Leu
 65 70 75 80

Thr Ile Gln Ile Glu Ser Ala Ala Asp Gln Asp Pro Ser Cys Leu Leu
 85 90 95

Cys Glu Asp Pro Gln Asp
 100

<210> 42

<211> 102

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 42

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Gly Leu
 1 5 10 15

Ser Tyr Asn Ser Val Lys Glu Ile Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Ile
 20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Val Asn Gln Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Val His Val Ala Thr Ala Ala Ser Trp Asp Ser Gln Ser Val
 50 55 60

Arg Thr Gly Ile Ala Gln Ala Leu Ser Ser Phe Asp Leu His Ser Leu
 65 70 75 80

Thr Ile Gln Ile Glu Ser Ala Ala Asp Gln Asp Pro Ser Cys Leu Leu
 85 90 95

Cys Glu Asp Pro Gln Asp
 100

10

<210> 43

<211> 103

<212> PRT

15 <213> *Mus musculus*

<400> 43

ES 2 533 566 T3

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Gly Leu
 1 5 10 15

Ser Tyr Asn Ser Val Lys Glu Ile Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Ile
 20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Val Asn Gln Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Val His Val Ala Thr Ala Ala Ser Gln Asp Ser Gln Ser Val
 50 55 60

Arg Thr Gly Ile Ala Gln Ala Leu Ser Lys Ser Phe Asp Leu His Ser
 65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Ile Glu Ser Ala Ala Asp Gln Asp Pro Ser Cys Leu
 85 90 95

Leu Cys Glu Asp Pro Gln Asp
 100

5 <210> 44
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 44

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Gly Leu
 1 5 10 15

Ser Tyr Asn Ser Val Lys Glu Ile Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Ile
 20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Val Asn Gln Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Val His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Ser Val
 50 55 60

Arg Thr Gly Ile Ala Gln Ala Leu Ser Lys Ser Phe Asp Leu His Ser
 65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Ile Glu Ser Ala Ala Asp Gln Asp Pro Ser Cys Leu
 85 90 95

Leu Cys Glu Asp Pro Gln Asp
 100

10 <210> 45
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 45

ES 2 533 566 T3

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Gly Leu
 1 5 10 15

Ser Tyr Asn Ser Val Lys Glu Ile Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Ile
 20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Val Asn Gln Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Val His Val Ala Thr Ala Ala Ser Trp Asp Ser Gln Ser Val
 50 55 60

Arg Thr Gly Ile Ala Gln Ala Leu Ser Lys Ser Phe Asp Leu His Ser
 65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Ile Glu Ser Ala Ala Asp Gln Asp Pro Ser Cys Leu
 85 90 95

Leu Cys Glu Asp Pro Gln Asp
 100

<210> 46

<211> 103

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 46

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Gly Leu
 1 5 10 15

Ser Tyr Asn Ser Val Lys Glu Ile Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Ile
 20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Val Asn Gln Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Val His Val Ala Thr Ala Ala Ser Gln Asp Ser Gln Ser Val
 50 55 60

Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Asp Leu His Ser
 65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Ile Glu Ser Ala Ala Asp Gln Asp Pro Ser Cys Leu
 85 90 95

Leu Cys Glu Asp Pro Gln Asp
 100

10

<210> 47

<211> 103

<212> PRT

15 <213> *Mus musculus*

<400> 47

ES 2 533 566 T3

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Gly Leu
 1 5 10 15

Ser Tyr Asn Ser Val Lys Glu Ile Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Ile
 20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Val Asn Gln Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Val His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Ser Val
 50 55 60

Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Asp Leu His Ser
 65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Ile Glu Ser Ala Ala Asp Gln Asp Pro Ser Cys Leu
 85 90 95

Leu Cys Glu Asp Pro Gln Asp
 100

<210> 48

<211> 103

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 48

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Gly Leu
 1 5 10 15

Ser Tyr Asn Ser Val Lys Glu Ile Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Ile
 20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Val Asn Gln Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Val His Val Ala Thr Ala Ala Ser Trp Asp Ser Gln Ser Val
 50 55 60

Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Asp Leu His Ser
 65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Ile Glu Ser Ala Ala Asp Gln Asp Pro Ser Cys Leu
 85 90 95

Leu Cys Glu Asp Pro Gln Asp
 100

10 <210> 49

<211> 103

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 49

ES 2 533 566 T3

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu
1 5 10 15

Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu
20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile
35 40 45

Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val
50 55 60

Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser
65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu
85 90 95

Phe Cys Glu Asp Pro Cys Asp
100

5 <210> 50
<211> 103
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 50

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu
1 5 10 15

Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu
20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile
35 40 45

Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Gln Asp Ser Gln Val Val
50 55 60

Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser
65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu
85 90 95

Phe Cys Glu Asp Pro Cys Asp
100

10 <210> 51
<211> 103
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 51

ES 2 533 566 T3

	Met	Lys	Asp	Phe	Ser	Ile	Leu	Leu	Met	Gl	u	Gly	Val	Pro	Lys	Ser	Leu
1										10							15
	Asn	Tyr	Ser	Gly	Val	Lys	Gl	u	Leu	Ile	Leu	Ala	Val	Asp	Gly	Val	Leu
							20				25					30	
	Ser	Val	His	Ser	Leu	His	Ile	Trp	Ser	Leu	Thr	Met	Asn	Gln	Val	Ile	
								40								45	
	Leu	Ser	Ala	His	Val	Ala	Thr	Ala	Ala	Ser	Trp	Asp	Ser	Gln	Val	Val	
							55									60	
	Arg	Arg	Gl	u	Ile	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser	Lys	Ser	Phe	Thr	Met	His	Ser
							65				70					80	
	Leu	Thr	Ile	Gln	Met	Gl	u	Ser	Pro	Val	Asp	Gln	Asp	Pro	Asp	Oys	Leu
								85								95	
	Phe	Oys	Gl	u	Asp	Pro	Oys	Asp									
								100									

<210> 52

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

10 <400> 52

	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	
1						5			10			

15 <210> 53

<211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 53

	Met	Lys	Asp	Phe	Ser	Ile	Leu	Leu	Met	Gl	u	Gly	Val	Pro	Lys	Ser	Leu
1										10							15

	Asn	Tyr	Ser	Gly	Val	Lys	Gl	u	Leu	Ile	Leu	Ala	Val	Asp	Gly	Val	Leu
							20				25					30	

	Ser	Val	His	Ser	Leu	His	Ile	Trp	Ser	Leu	Thr	Met	Asn	Gln	Val	Ile	
								40								45	

ES 2 533 566 T3

Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val
 50 55 60
 Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser
 65 70 75 80
 Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Oys Leu
 85 90 95
 Phe Oys Glu Asp Pro Oys Asp Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser
 115 120 125
 Leu Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val
 130 135 140
 Leu Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val
 145 150 155 160
 Ile Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val
 165 170 175
 Val Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His
 180 185 190
 Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Oys
 195 200 205
 Leu Phe Oys Glu Asp Pro Oys Asp
 210 215

<210> 54

<211> 216

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 54

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

ES 2 533 566 T3

Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu
 85 90 95

 Phe Cys Glu Asp Pro Cys Asp Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly
 100 105 110

 Gly Gly Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser
 115 120 125

 Leu Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val
 130 135 140

 Leu Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val
 145 150 155 160

 Ile Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Gln Asp Ser Gln Val
 165 170 175

 Val Arg Arg Guille Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His
 180 185 190

 Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys
 195 200 205

 Leu Phe Cys Glu Asp Pro Cys Asp
 210 215

<210> 55
 <211> 216
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 55

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu
 1 5 10 15

 Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu
 20 25 30

 Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile
 35 40 45

 Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val
 50 55 60

 Arg Arg Guille Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser
 65 70 75 80

 Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu
 85 90 95

ES 2 533 566 T3

Phe Cys Glu Asp Pro Cys Asp Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly
 100 105 110

Gly Gly Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser
 115 120 125

Leu Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val
 130 135 140

Leu Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val
 145 150 155 160

Ile Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Trp Asp Ser Gln Val
 165 170 175

Val Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His
 180 185 190

Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys
 195 200 205

Leu Phe Cys Glu Asp Pro Cys Asp
 210 215

<210> 56
 <211> 216
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 56

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu
 1 5 10 15

Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu
 20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Gln Asp Ser Gln Val Val
 50 55 60

Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser
 65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu
 85 90 95

Phe Cys Glu Asp Pro Cys Asp Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly
 100 105 110

Gly Gly Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser
 115 120 125

ES 2 533 566 T3

Leu Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val
 130 135 140

Leu Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val
 145 150 155 160

Ile Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Gln Asp Ser Gln Val
 165 170 175

Val Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His
 180 185 190

Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys
 195 200 205

Leu Phe Cys Glu Asp Pro Cys Asp
 210 215

<210> 57

<211> 216

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 57

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu
 1 5 10 15

Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu
 20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Gln Asp Ser Gln Val Val
 50 55 60

Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser
 65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu
 85 90 95

Phe Cys Glu Asp Pro Cys Asp Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly
 100 105 110

Gly Gly Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser
 115 120 125

Leu Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val
 130 135 140

ES 2 533 566 T3

Leu Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val
 145 150 155 160
 Ile Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val
 165 170 175
 Val Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His
 180 185 190
 Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys
 195 200 205
 Leu Phe Cys Glu Asp Pro Cys Asp
 210 215

<210> 58

<211> 216

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 58

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu
 1 5 10 15
 Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu
 20 25 30
 Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile
 35 40 45
 Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Gln Asp Ser Gln Val Val
 50 55 60
 Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser
 65 70 75 80
 Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu
 85 90 95
 Phe Cys Glu Asp Pro Cys Asp Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser
 115 120 125
 Leu Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val
 130 135 140
 Leu Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val
 145 150 155 160
 Ile Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Gln Asp Ser Trp Val
 165 170 175

10

Val Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His
 180 185 190

Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys
 195 200 205

Leu Phe Oys Glu Asp Pro Oys Asp
 210 215

<210> 59

<211> 216

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 59

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu
 1 5 10 15

Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu
 20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Trp Asp Ser Gln Val Val
 50 55 60

Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser
 65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Oys Leu
 85 90 95

Phe Oys Glu Asp Pro Oys Asp Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly
 100 105 110

Gly Gly Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser
 115 120 125

Leu Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val
 130 135 140

Leu Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val
 145 150 155 160

Ile Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Trp Asp Ser Gln Val
 165 170 175

Val Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His
 180 185 190

Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Oys
 195 200 205

Leu Phe Oys Glu Asp Pro Oys Asp
 210 215

ES 2 533 566 T3

<210> 60
<211> 216
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 60

Met	Lys	Asp	Phe	Ser	Ile	Leu	Leu	Met	Glu	Gly	Val	Pro	Lys	Ser	Leu
1					5				10						15
Asn	Tyr	Ser	Gly	Val	Lys	Glu	Leu	Ile	Leu	Ala	Val	Asp	Gly	Val	Leu
					20				25					30	
Ser	Val	His	Ser	Leu	His	Ile	Trp	Ser	Leu	Thr	Met	Asn	Gln	Val	Ile
					35			40						45	
Leu	Ser	Ala	His	Val	Ala	Thr	Ala	Ala	Ser	Trp	Asp	Ser	Gln	Val	Val
					50			55						60	
Arg	Arg	Glu	Ile	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser	Lys	Ser	Phe	Thr	Met	His	Ser
					65			70			75			80	
Leu	Thr	Ile	Gln	Met	Glu	Ser	Pro	Val	Asp	Gln	Asp	Pro	Asp	Oys	Leu
					85			90						95	
Phe	Cys	Glu	Asp	Pro	Oys	Asp	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly
					100			105						110	
Gly	Gly	Lys	Asp	Phe	Ser	Ile	Leu	Leu	Met	Glu	Gly	Val	Pro	Lys	Ser
					115			120						125	
Leu	Asn	Tyr	Ser	Gly	Val	Lys	Glu	Leu	Ile	Leu	Ala	Val	Asp	Gly	Val
					130			135						140	
Leu	Ser	Val	His	Ser	Leu	His	Ile	Trp	Ser	Leu	Thr	Met	Asn	Gln	Val
					145			150						160	
Ile	Leu	Ser	Ala	His	Val	Ala	Thr	Ala	Ala	Ser	Arg	Asp	Ser	Gln	Val
					165			170						175	
Val	Arg	Arg	Glu	Ile	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser	Lys	Ser	Phe	Thr	Met	His
					180			185						190	
Ser	Leu	Thr	Ile	Gln	Met	Glu	Ser	Pro	Val	Asp	Gln	Asp	Pro	Asp	Oys
					195			200						205	
Leu	Phe	Oys	Glu	Asp	Pro	Oys	Asp								
					210			215							

10

<210> 61
<211> 216
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 61

ES 2 533 566 T3

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu
 1 5 10 15

Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu
 20 25 30

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Trp Asp Ser Gln Val Val
 50 55 60

Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser
 65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu
 85 90 95

Phe Cys Glu Asp Pro Cys Asp Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly
 100 105 110

Gly Gly Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser
 115 120 125

Leu Asn Tyr Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val
 130 135 140

Leu Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val
 145 150 155 160

Ile Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Gln Asp Ser Gln Val
 165 170 175

Val Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His
 180 185 190

Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys
 195 200 205

Leu Phe Cys Glu Asp Pro Cys Asp
 210 215

<210> 62
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 62

ES 2 533 566 T3

Met	Glu	Phe	Leu	Glu	Arg	Thr	Tyr	Leu	Val	Asn	Asp	Lys	Ala	Ala	Lys
1				5				10					15		
Met	Tyr	Ala	Phe	Thr	Leu	Glu	Ser	Val	Glu	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Val
	20				25				30						
Asn	Lys	Asp	Gln	Oys	Pro	Arg	Glu	Arg	Pro	Glu	Glu	Leu	Glu	Ser	Gly
	35				40			45							
Gly	Met	Tyr	His	Oys	His	Ser	Gly	Ser	Lys	Pro	Thr	Glu	Lys	Gly	Ala
	50				55				60						
Asn	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Ala	Lys	Trp	Lys	Leu	Oys	Ser	Gly	Gly	Gly	Lys
	65			70		75				80					
Asp	Phe	Ser	Ile	Leu	Leu	Met	Glu	Gly	Val	Pro	Lys	Ser	Leu	Asn	Tyr
	85				90					95					
Ser	Gly	Val	Lys	Glu	Leu	Ile	Leu	Ala	Val	Asp	Gly	Val	Leu	Ser	Val
	100				105					110					
His	Ser	Leu	His	Ile	Trp	Ser	Leu	Thr	Met	Asn	Gln	Val	Ile	Leu	Ser
	115				120				125						
Ala	His	Val	Ala	Thr	Ala	Ala	Ser	Trp	Asp	Ser	Gln	Val	Val	Arg	Arg
	130				135				140						
Glu	Ile	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser	Lys	Ser	Phe	Thr	Met	His	Ser	Leu	Thr
	145				150				155					160	
Ile	Gln	Met	Glu	Ser	Pro	Val	Asp	Gln	Asp	Pro	Asp	Oys	Leu	Phe	Oys
	165				170				175						
Glu	Asp	Pro	Oys	Asp											
	180														

<210> 63

<211> 181

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Met	Glu	Phe	Leu	Glu	Arg	Thr	Tyr	Leu	Val	Asn	Asp	Lys	Ala	Ala	Lys
1				5				10					15		
Met	Tyr	Ala	Phe	Thr	Leu	Glu	Ser	Val	Glu	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Val
	20				25				30						
Asn	Lys	Asp	Gln	Oys	Pro	Arg	Glu	Arg	Pro	Glu	Glu	Leu	Glu	Ser	Gly
	35				40			45							

ES 2 533 566 T3

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 Gly Gly Gly Lys
 65 70 75 80
 Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu Asn Tyr
 85 90 95
 Ser Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu Ser Val
 100 105 110
 His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile Leu Ser
 115 120 125
 Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val Arg Arg
 130 135 140
 Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser Leu Thr
 145 150 155 160
 Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu Phe Cys
 165 170 175
 Glu Asp Pro Cys Asp
 180

<210> 64

<211> 132

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 64

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

ES 2 533 566 T3

100

105

110

G n Met Gl u Ser Pro Val Asp G n Asp Pro Asp Oys Leu Phe Cys Gl u
 115 120 125

Asp Pro Oys Asp
 130

<210> 65

<211> 132

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 65

Met Tyr His Oys His Ser Gly Ser Lys Pro Thr Gl u Lys Gly Ala Asn
 1 5 10 15

Gl u Tyr Ala Tyr Ala Lys Trp Lys Leu Oys Ser Gly Gly Lys Asp
 20 25 30

Phe Ser Ile Leu Leu Met Gl u Gly Val Pro Lys Ser Leu Asn Tyr Ser
 35 40 45

Gly Val Lys Gl u Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu Ser Val His
 50 55 60

Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn G n Val Ile Leu Ser Ala
 65 70 75 80

His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser G n Val Val Arg Arg Gl u
 85 90 95

Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser Leu Thr Ile
 100 105 110

G n Met Gl u Ser Pro Val Asp G n Asp Pro Asp Oys Leu Phe Cys Gl u
 115 120 125

Asp Pro Oys Asp
 130

10

<210> 66

<211> 182

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 66

Met Lys Asp Phe Ser Ile Leu Leu Met Gl u Gly Val Pro Lys Ser Leu
 1 5 10 15

Asn Tyr Ser Gly Val Lys Gl u Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu
 20 25 30

ES 2 533 566 T3

Ser Val His Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile
 35 40 45

Leu Ser Ala His Val Ala Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val
 50 55 60

Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser
 65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu
 85 90 95

Phe Cys Glu Asp Pro Oys Asp Gly Gly Met Glu Phe Leu Glu Arg
 100 105 110

Thr Tyr Leu Val Asn Asp Lys Ala Ala Lys Met Tyr Ala Phe Thr Leu
 115 120 125

Glu Ser Val Glu Leu Gln Gln Lys Pro Val Asn Lys Asp Gln Cys Pro
 130 135 140

Arg Glu Arg Pro Glu Glu Leu Glu Ser Gly Gly Met Tyr His Cys His
 145 150 155 160

Ser Gly Ser Lys Pro Thr Glu Lys Gly Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Ala
 165 170 175

Lys Trp Lys Leu Cys Ser
 180

<210> 67

<211> 244

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 67

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

Met Tyr 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 Asp Ala
 65 70 75 80

Ala His Leu Leu Ile Asp Ser Ser Lys Pro Pro Ser Lys Arg Leu Thr
 85 90 95

ES 2 533 566 T3

Phe Gly Trp His Arg Ala Glu Cys Glu Arg Leu Leu Tyr Pro Asp Tyr
100 105 110

Gln Ile Gln Ala Thr Leu His Gln Arg Cys Leu Gly His Asn His Lys
115 120 125

Gl u Val Gln Ala Asn Ala Ser Val Arg Lys Pro Glu Tyr Lys Lys Asp
130 135 140

Phe Ser Ile Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu Asn Tyr Ser
145 150 155 160

Gly Val Lys Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu Ser Val His
165 170 175

Ser Leu His Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile Leu Ser Ala
180 185 190

His Val Ala Thr Ala Ala Ser Trp Asp Ser Gln Val Val Arg Arg Glu
195 200 205

Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser Leu Thr Ile
210 215 220

Gln Met Glu Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Oys Leu Phe Oys Glu
225 230 235 240

Asp Pro Oys Asp

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de ZnT8 que consiste en un fragmento representado por una cualquiera de las SEC ID Nº: 9, 10, 14-18, 22, 23, 49-51 o 53-65, en donde el fragmento comprende la secuencia de aminoácidos SLTIQMES (posiciones 346-353 de la SEC ID Nº: 2) y la posición 325 de la SEC ID Nº: 2.
- 5 2. Una proteína quimérica, que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en, cualquiera de dos o más fragmentos representados en la reivindicación 1.
- 10 3. La proteína quimérica de la Reivindicación 2, en donde la proteína quimérica comprende un fragmento N-terminal de ZnT8 y un fragmento C-terminal de ZnT8.
- 15 4. La proteína quimérica de la Reivindicación 2, en donde la proteína quimérica comprende dos fragmentos C-terminal de ZnT8, en donde cada uno de los fragmentos comprende un aminoácido diferente en la posición 325.
- 15 5. La proteína quimérica de la Reivindicación 4, en la que un fragmento comprende una arginina en la posición 325 y en la que un segundo fragmento comprende un triptófano en la posición 325.
- 20 6. El fragmento de la Reivindicación 1, en donde el fragmento comprende al menos un epítopo de ZnT8 que está selectivamente unido mediante un anticuerpo anti-ZnT8.
- 20 7. El fragmento de la Reivindicación 6, en el que el anticuerpo anti-ZnT8 es un anticuerpo obtenido de un individuo.
- 25 8. El fragmento de la Reivindicación 6, en donde el individuo tiene, o se sospecha que tiene, diabetes de tipo I.
- 25 9. Uso del fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el diagnóstico de un individuo que es susceptible a, o que está desarrollando una enfermedad autoinmunitaria, que comprende detectar, en una muestra de ensayo del individuo, anticuerpos que se unen selectivamente al fragmento ZnT8, en donde la detección del aumento de anticuerpos en el individuo comparada con un control negativo, indica que el individuo es susceptible a, o está desarrollando, la enfermedad autoinmunitaria.
- 30 10. El uso de la Reivindicación 9, en el que el aminoácido en la posición 325 del fragmento se selecciona del grupo que consiste en arginina, triptófano y glutamina.
- 35 11. El uso de la Reivindicación 9, en el que la enfermedad autoinmunitaria es la diabetes de tipo I.
- 40 12. Uso de los fragmentos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 6 a 8 para controlar en un individuo la progresión de la diabetes autoinmunitaria de tipo I, a partir de una autorreactividad benigna inicial a insulinitis destructora, que comprende detectar anticuerpos que se unen selectivamente al fragmento ZnT8 en una muestra de ensayo del individuo, en donde la detección del aumento de anticuerpos en el individuo comparada con una medición previa de anticuerpos en el mismo individuo, indica que el individuo está progresando hacia insulinitis destructora.
- 45 13. El uso de la Reivindicación 12, en el que el aminoácido en la posición 325 del fragmento se selecciona del grupo que consiste en arginina, triptófano y glutamina.
- 50 14. Uso de los fragmentos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 6 a 8 para controlar la eficacia de un tratamiento para prevenir la diabetes de tipo I, retrasar la aparición de la diabetes de tipo I, o mejorar la autoinmunidad en individuos prediabéticos, que comprende detectar anticuerpos que se unen selectivamente al fragmento ZnT8 en una muestra de ensayo del individuo, en donde la detección de la disminución del nivel o sustancialmente del mismo nivel de anticuerpos en el individuo comparada con una medición previa de anticuerpos en el mismo individuo, indica que el tratamiento es eficaz, y en donde la detención del aumento de anticuerpos en el individuo comparada con una medición previa de anticuerpos en el mismo individuo indica que el tratamiento no es eficaz.
- 55 15. El uso de la Reivindicación 14, en el que el aminoácido en la posición 325 del fragmento se selecciona del grupo que consiste en arginina, triptófano y glutamina.
- 60 16. El uso de una cualquiera de las Reivindicaciones 9-15, en donde el uso incluye el uso de un ensayo seleccionado del grupo que consiste en: ensayo de radioinmunoprecipitación, ELISA, ensayo de inmunofluorescencia, ensayo de fluorescencia resuelta en tiempo, ensayos de separación de células activadas por fluorescencia, ensayo competitivo con Europio y ensayo con luminiscencia.

FIG. 1

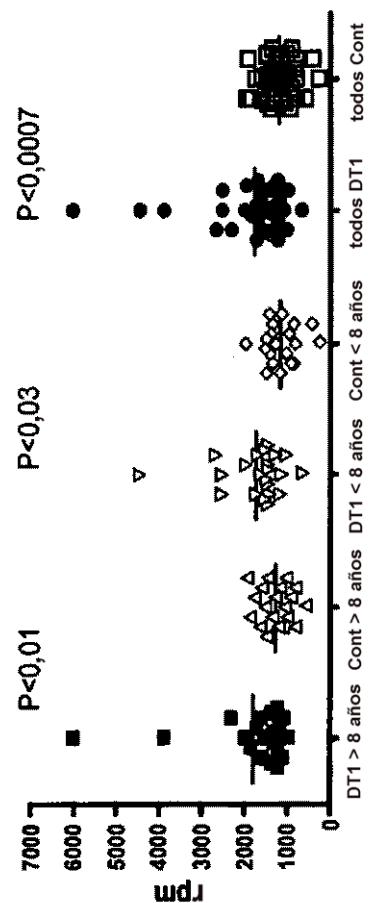


FIG. 2B

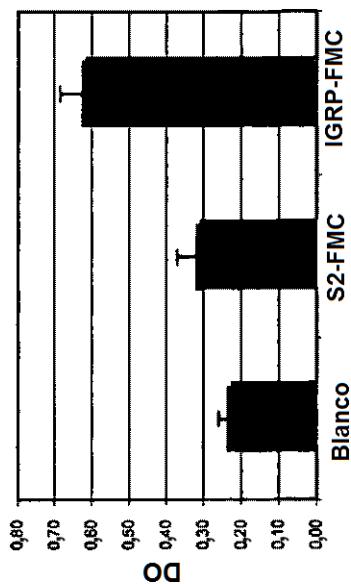


FIG. 2A

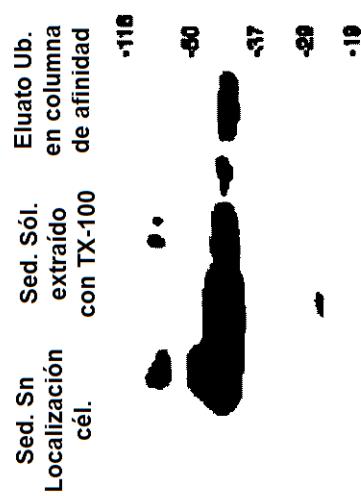


FIG. 3

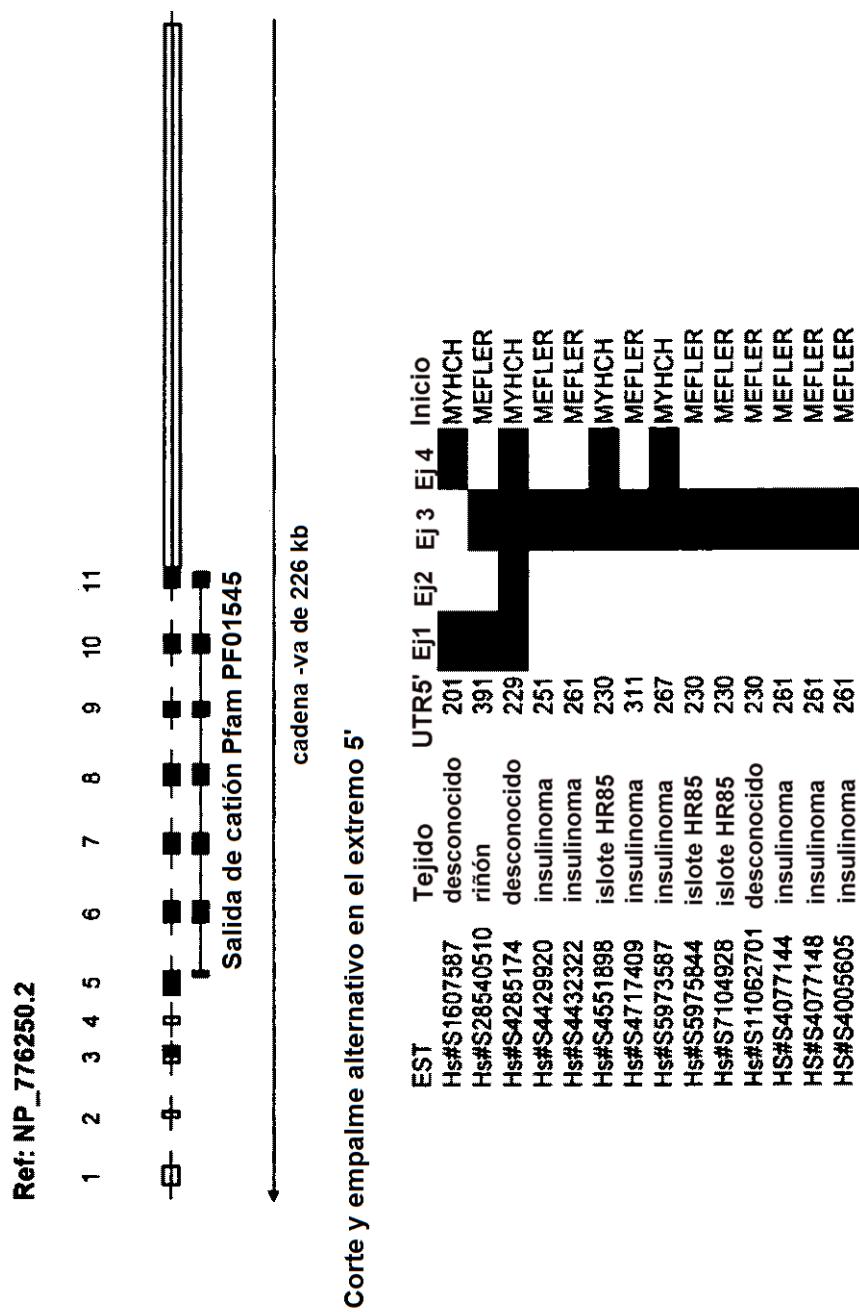
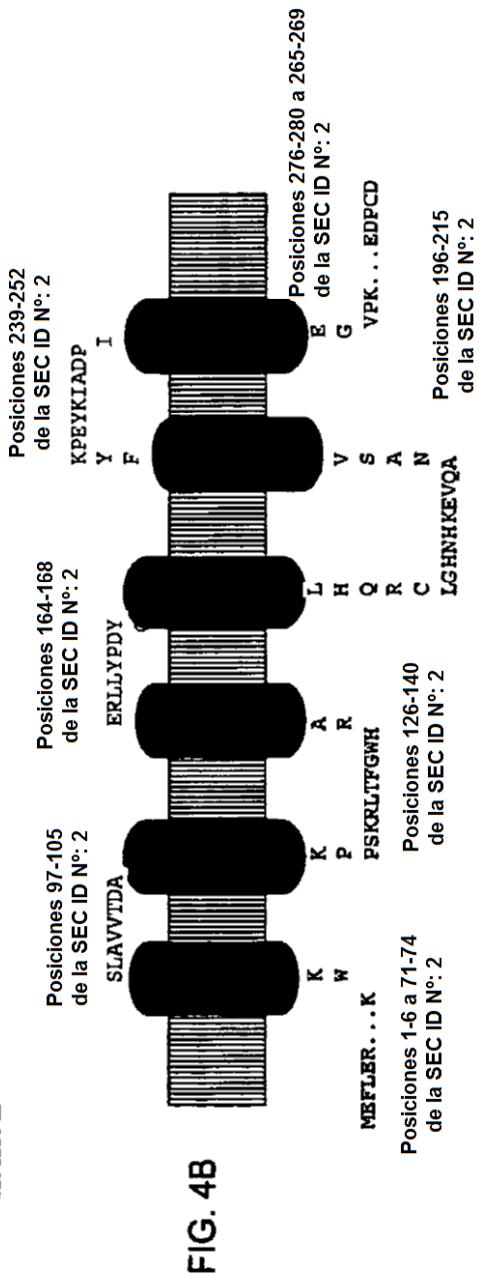


FIG. 4A

MEFLERTLV NDKAAAMHAF	20	TILEVELOK	30	PVNQDQCPRE	40	RPEELESQGM	50	YHCISGSKPT	60
EKGANEYAYA KWKL.	70	80	[REDACTED]	90	100	[REDACTED]	110	SLAV VTDA	120
[REDACTED]	130	140	[REDACTED]	150	160	[REDACTED]	170	ERLLYD YQ	[REDACTED]
[REDACTED]	190	200	LHQRC LGINHKEVQA	210	220	[REDACTED]	230	240	[REDACTED] YP
KPEVKIADPI CT	250	260	[REDACTED]	270	280	[REDACTED]	290	EGVPK SLAYSGUVEL	300 ILAVDGVLSV
HSLRHTWSUTM NQVILSAHVA TAAS	310	320	[REDACTED]	330	340	[REDACTED]	350	SPTMHSLTIQ	360 MESPVDQDD
CLFCEDPPD	SEC ID N°: 2								



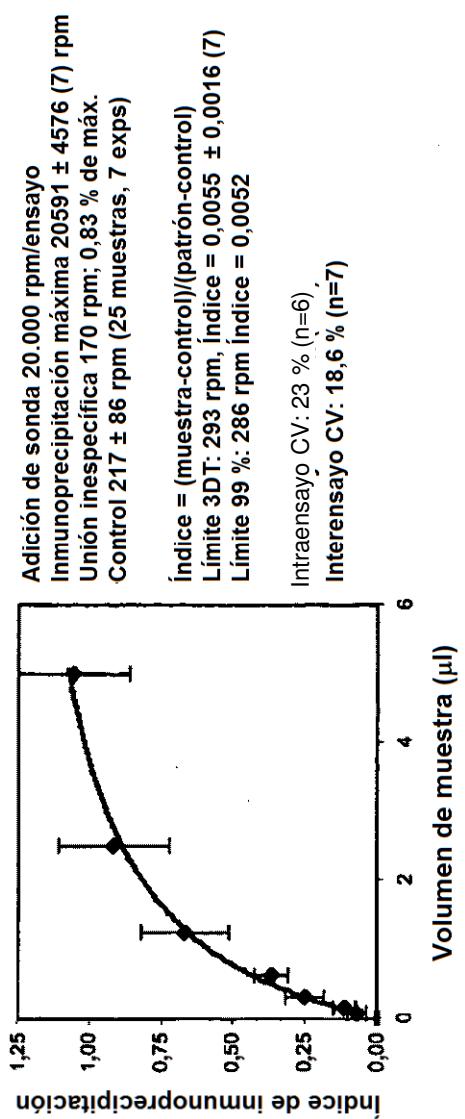


FIG. 5



FIG. 6

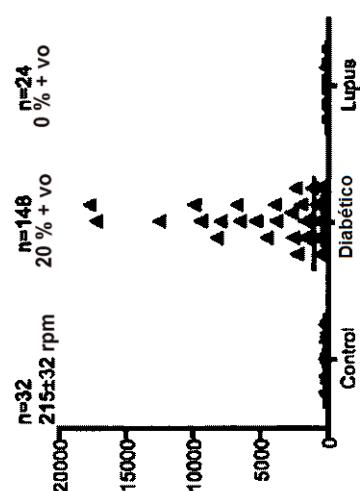


FIG. 7

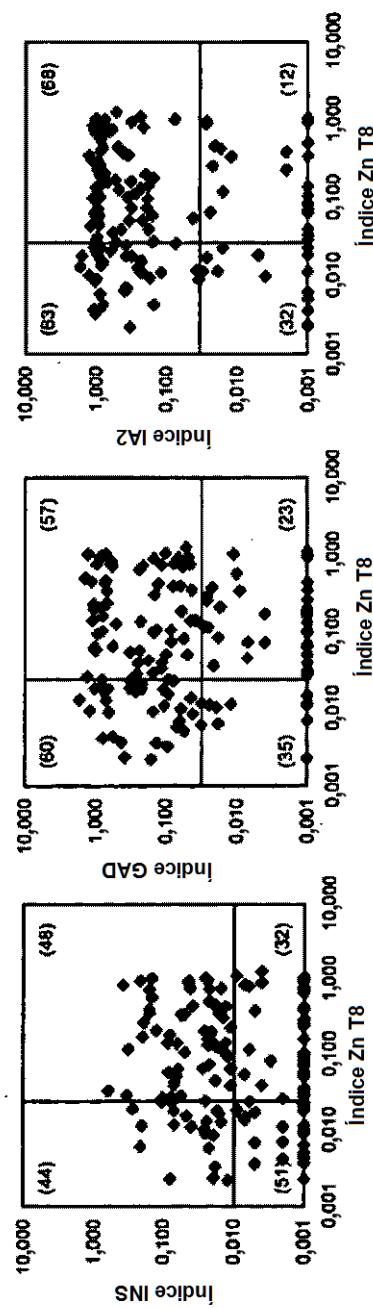


FIG. 9B

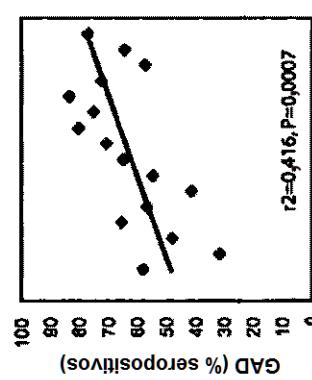


FIG. 9D

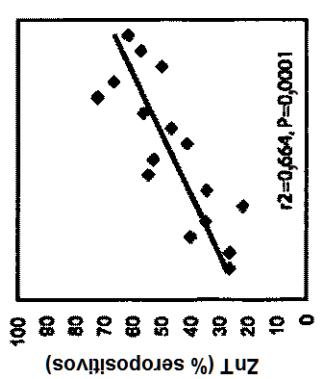
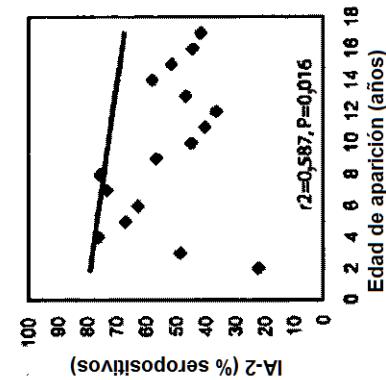


FIG. 9A

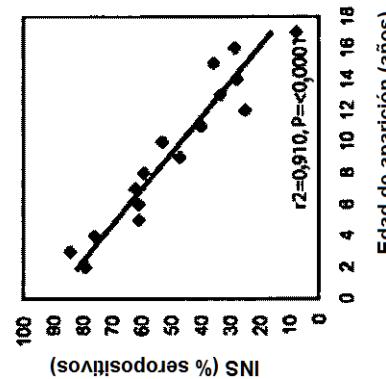


FIG. 9C

FIG.10A

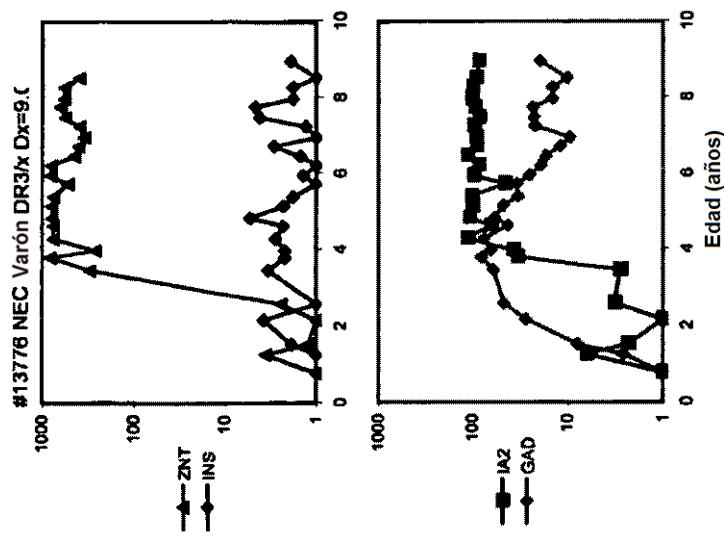


FIG.10B

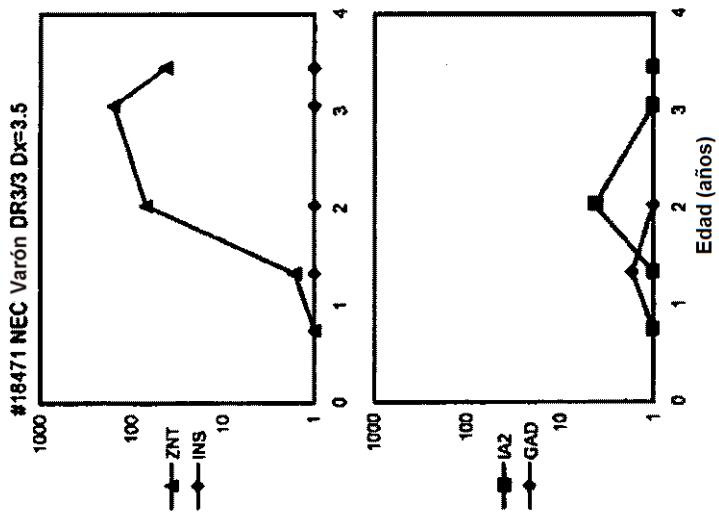


FIG. 11

Estado de anticuerpos	ZnT8C			ZnT8		
	INS/GAD/IA2	INS/GAD/IA2	GAD/IA2	INS/GAD/IA2	ZnT8C	GAD/IA2
5Ab	-	-	-	16	-	-
>4Ab	-	-	-	34	-	-
>3Ab	44	64	42	78	72	72
>2Ab	72	92	92	92	92	92
>1Ab	86	8	8	8	8	8
0Ab	14					

Estado de anticuerpos	ZnT8ORF			ZnT8C			IA2			GAD65			INS		Total
	ZnT8ORF	ZnT8C	IA2	ZnT8C	IA2	GAD65	INS	INS	Total	INS	GAD65	INS	INS	INS	
5Ab	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
4Ab	0	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
3Ab	2	9	12	12	12	12	12	12	15	10	10	10	10	10	15
2Ab	0	2	4	4	4	6	6	6	7	2	2	2	2	2	7
1Ab	1	3	1	3	1	3	3	3	8	0	0	0	0	0	8
0Ab	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	3	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	3
Solo ICA+	0	2	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	8

FIG. 12B

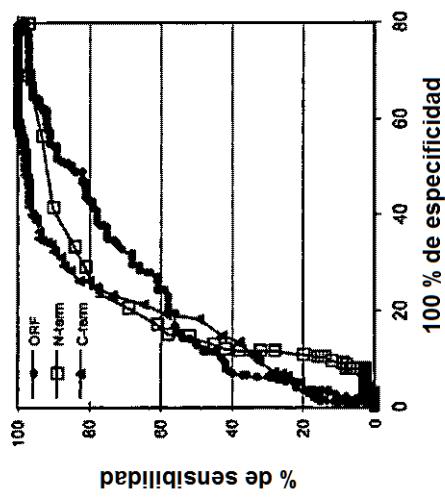


FIG. 12A

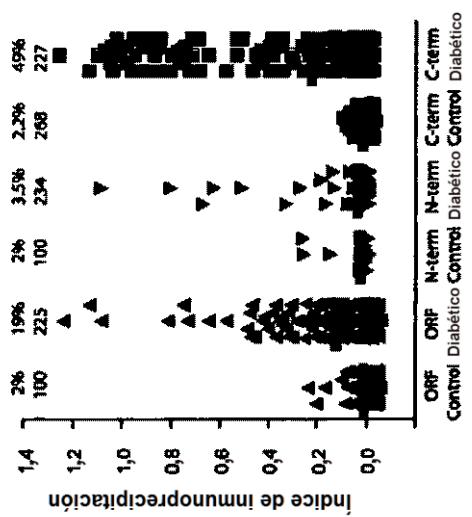


FIG. 13

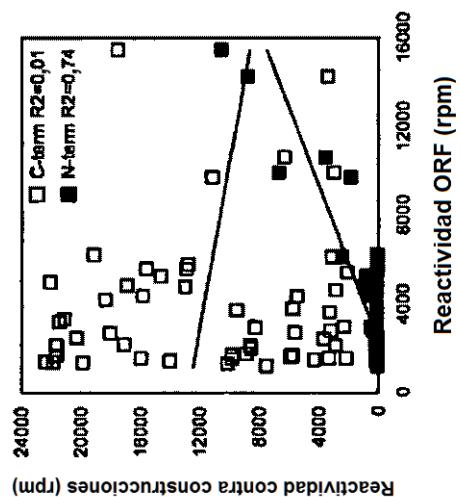


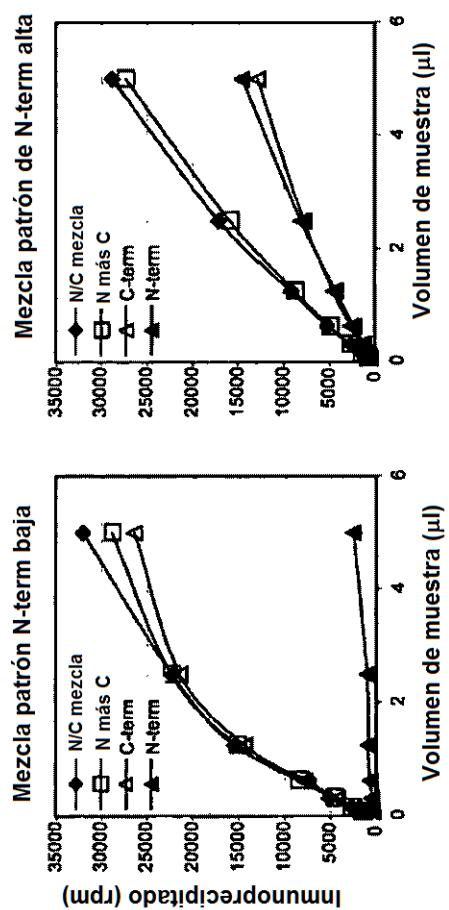
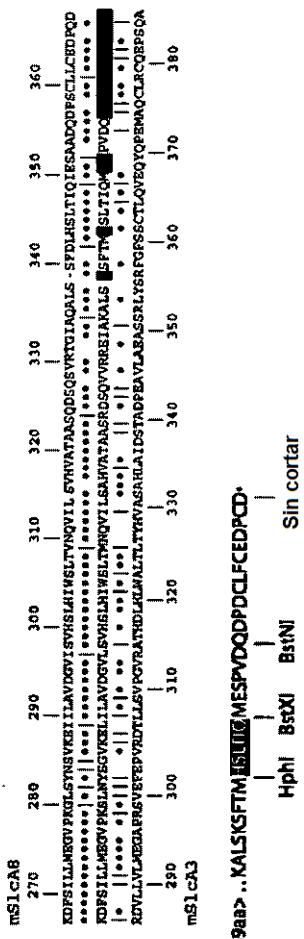
FIG. 14A
FIG. 14B

FIG. 15A



■ Sin cortar
 ▲ Hphi
 □ BstXI
 ● BsrNI

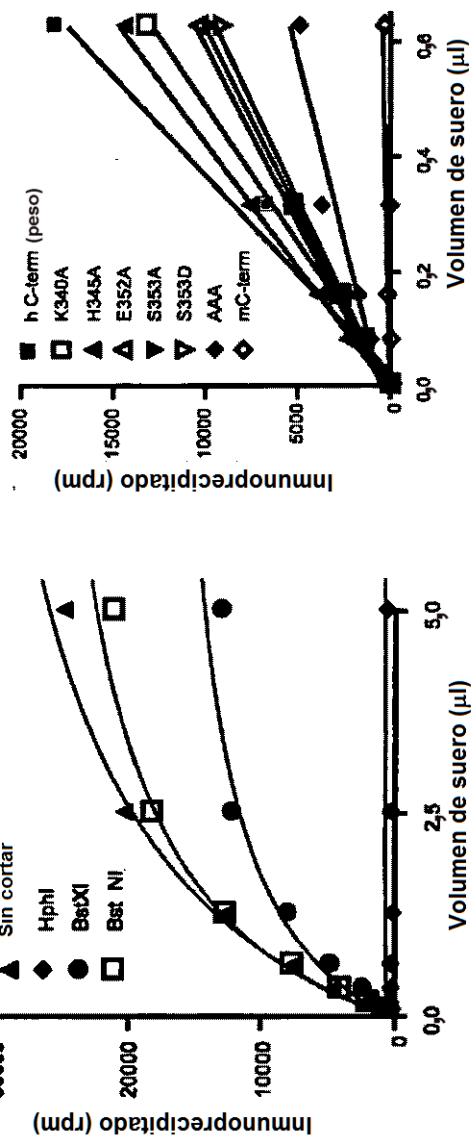


FIG. 15C

FIG. 15B

<u>SIC30A8</u>		Posiciones 342-358 de la SEC ID N°: 2		Posiciones 340-356 de la SEC ID N°: 4	
Ser humano					
Mono	VY				SEC ID N°:26
Perro	YY	A			SEC ID N°:27
Rata	DIL	I AA			SEC ID N°:28
Ratón	DIL	I AA			Posiciones 340-356 de la SEC ID N°: 4
Vaca	PV	SCSPTRI	SEC ID N°:29		
Sapo	PF	V VPIE S	SEC ID N°:30		
Pollo	YSF	I I GGE	SEC ID N°:31		
Pez	YSF	V L PQA R	SEC ID N°:32		
<u>Otra CzCD</u>					
hS1c30A2	HFTV	I DYSEDM	SEC ID N°:33		
hS1c30A3	GRSSC	LIV QYQPEM	SEC ID N°:34		
Pyrococcus	GITHV	L TGRCKE	SEC ID N°:35		
<u>No relacionado</u>					
E.coli	VDGNQI	KIIVQ	SEC ID N°:36		
hREEP3	SMHDLT	GDE GR	SEC ID N°:37		

FIG. 16

FIG. 17

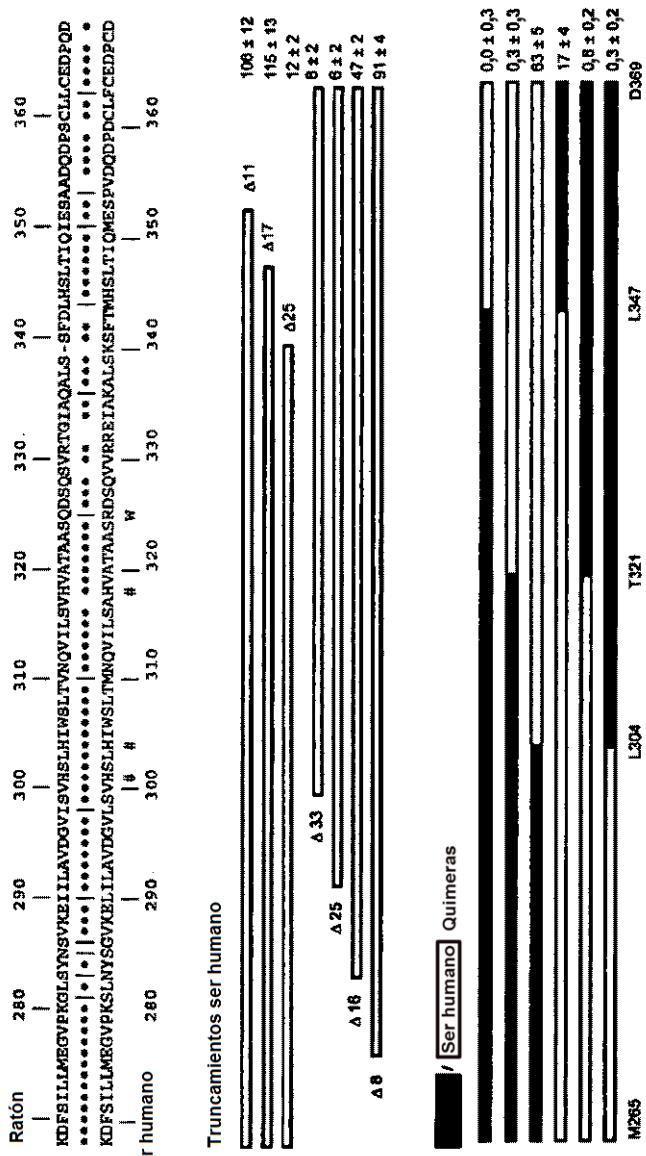


FIG. 18
Interfaz del dímero perpendicular a la membrana

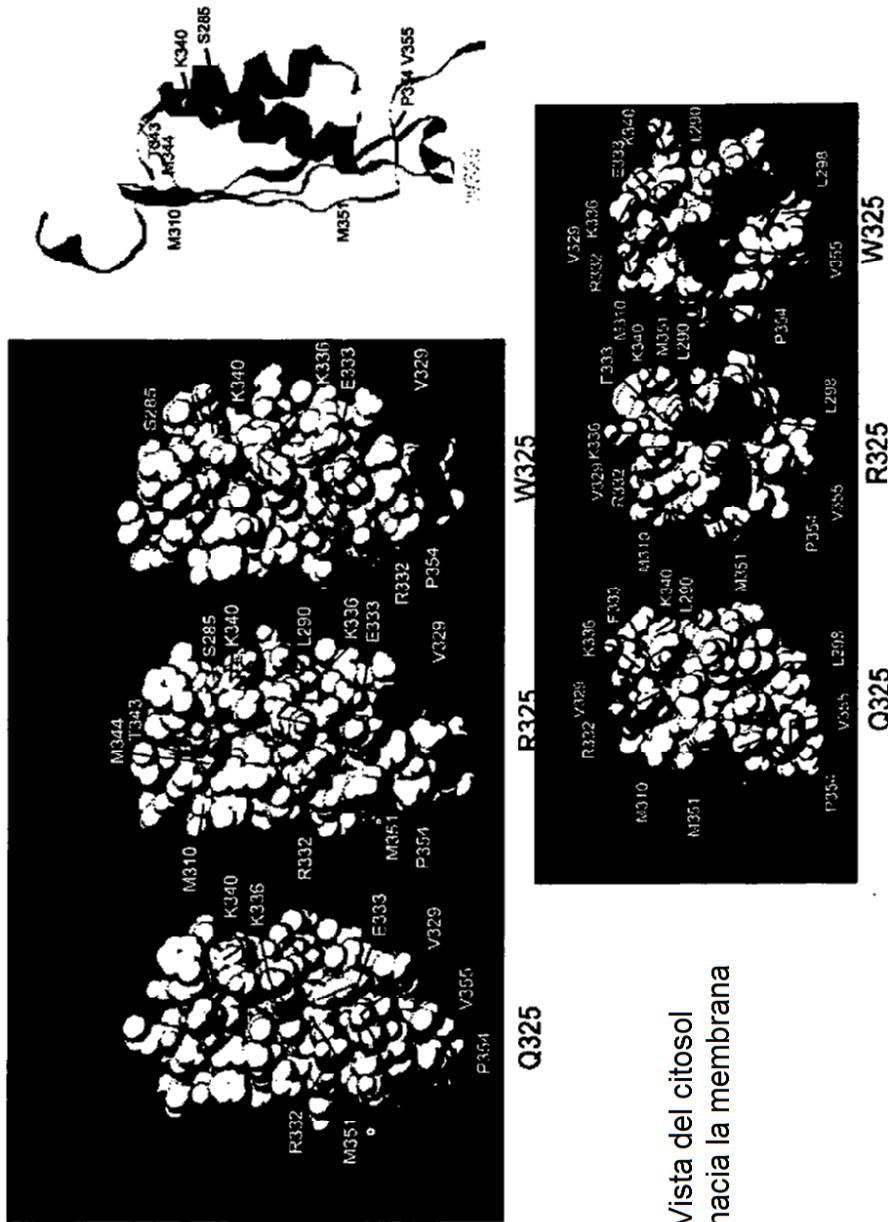


FIG. 19

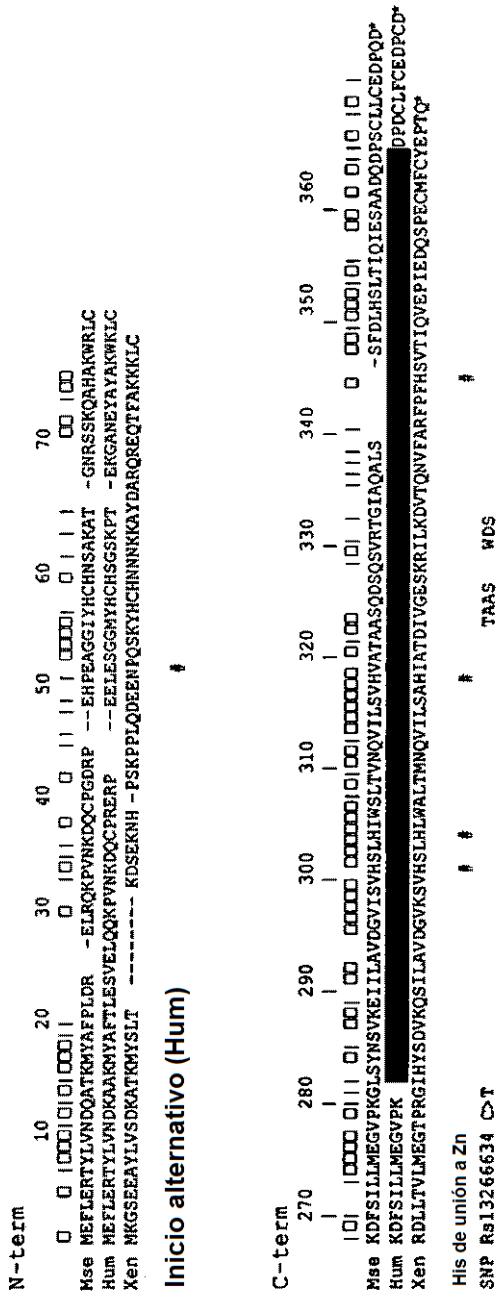


FIG. 20

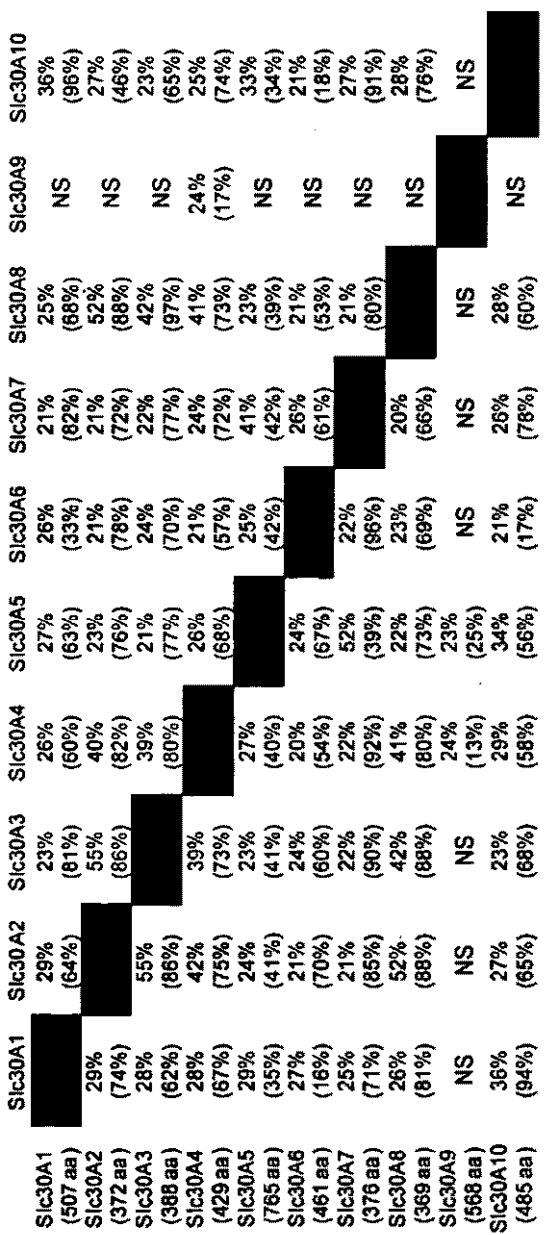


FIG. 21A FIG. 21B FIG. 21C

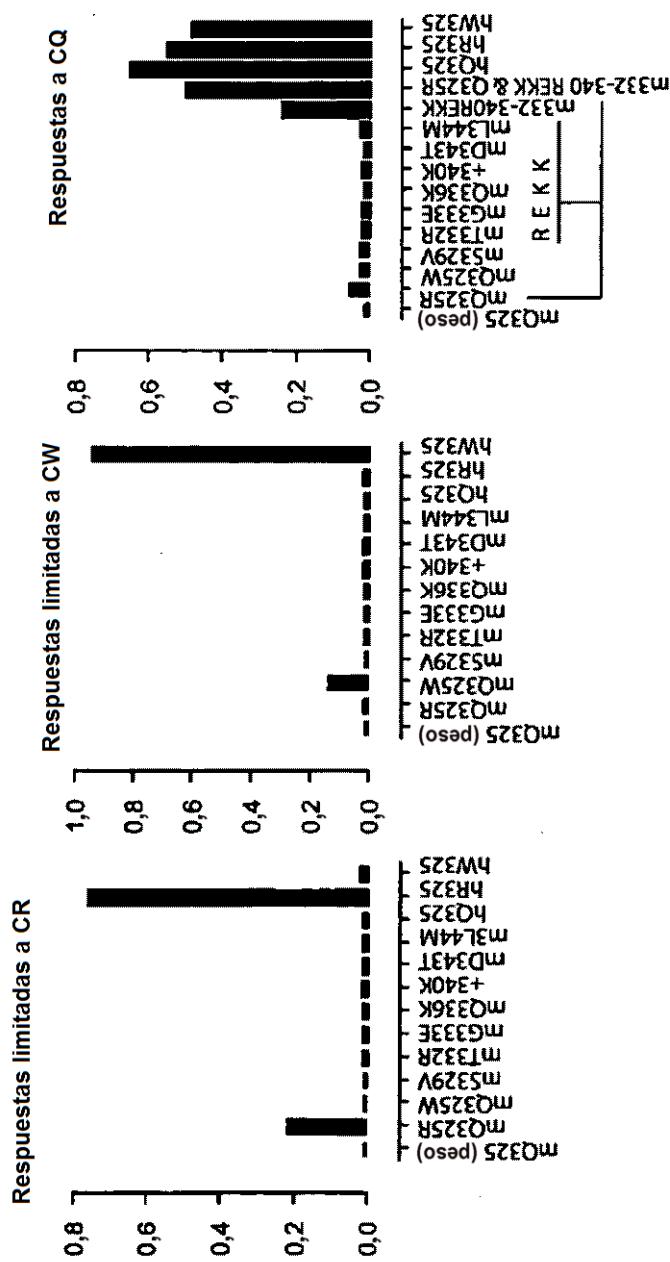


FIG. 22A

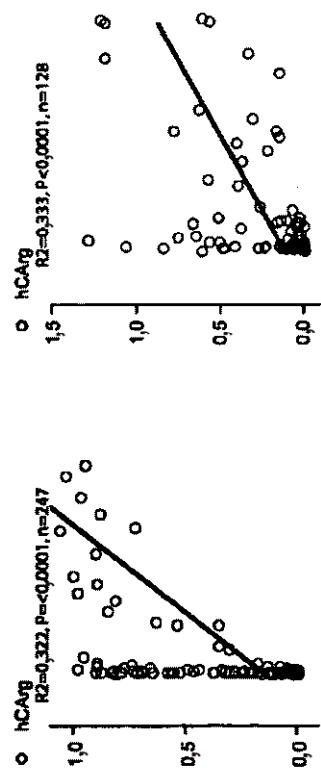


FIG. 22B

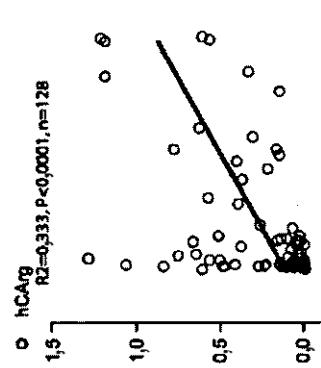


FIG. 22C

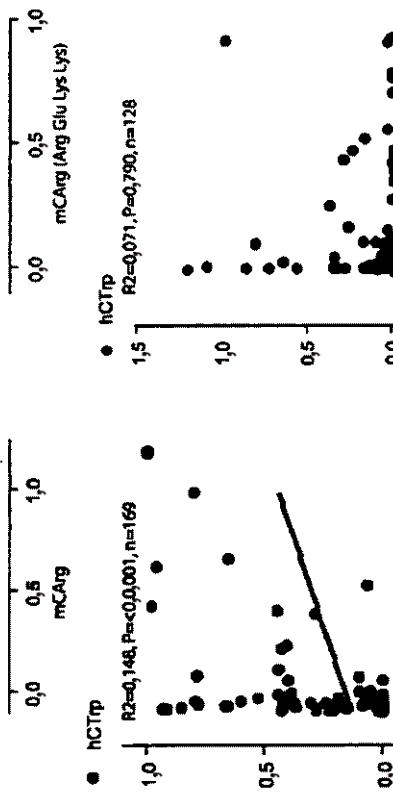


FIG. 22D

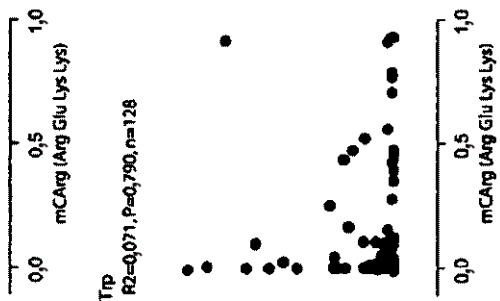


FIG. 23A

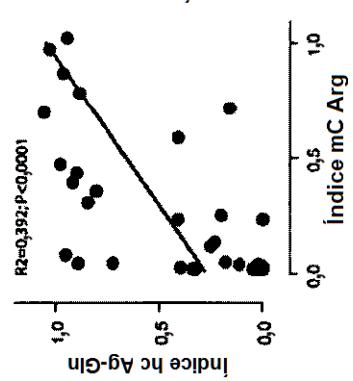


FIG. 23B

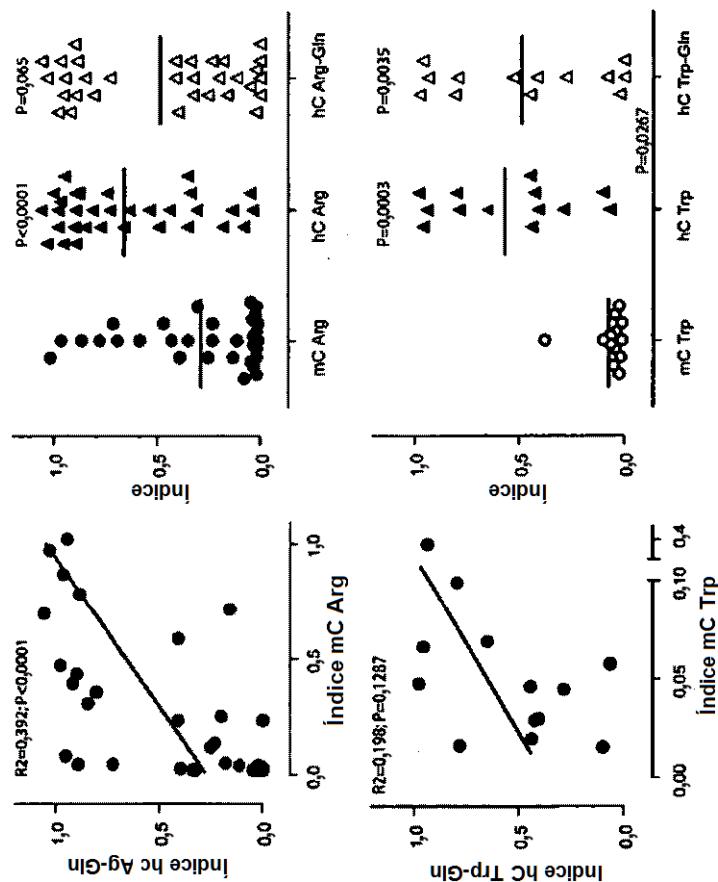


FIG. 23C

FIG. 23D

FIG. 24A

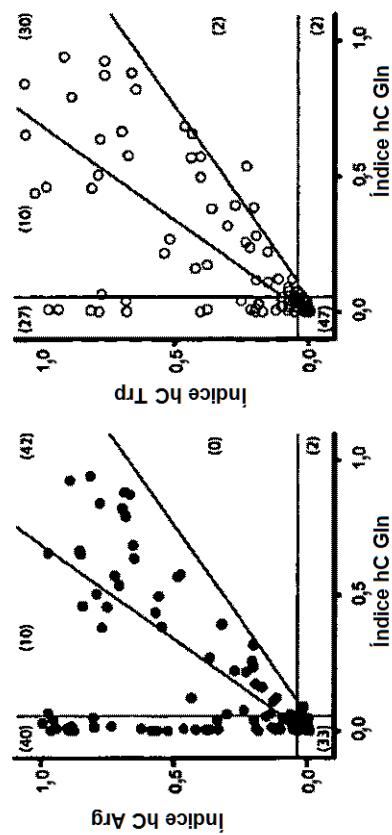


FIG. 24B

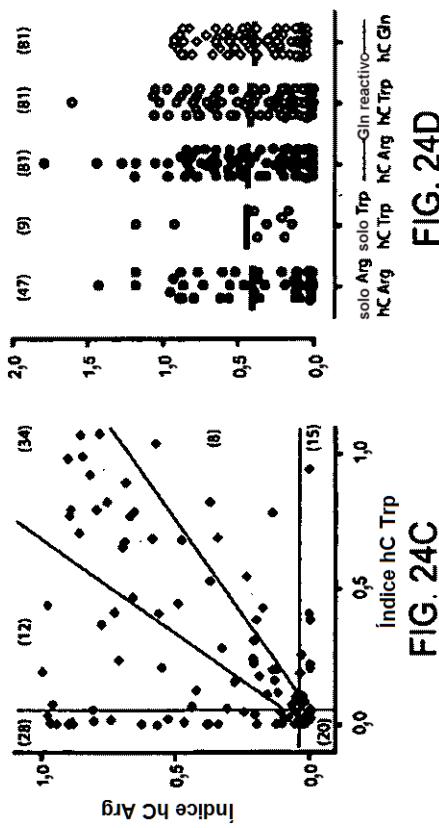


FIG. 24D

FIG. 24C

FIG. 25

Reactividad a sondas	Genotipo					
	cualquiera (300)		CC (169)		CT (108)	
	n	%	n	%	n	%
cualquiera	198	66,0	116	68,6	63	58,4
Todas	96	32,0	58	34,3	33	30,6
Gln	113	37,7	69	40,8	38	35,2
Arg	179	59,7	115	68,0	57	52,8
Trp	138	46,0	64	37,9	55	50,9
solo Gln	1*	0,3	1	0,6	0	0,0
solo Arg	47	15,7	41	24,3	6	5,6
solo Trp	15	5,0	0	0,0	4	3,7
Arg y Trp (Gln<0,02)	13	4,3	2*	1,2	11	10,2
Arg>Gln	55	18,3	50	29,6	5	4,6
Trp>Gln	17	5,7	1	0,6	12	11,1
Arg>Gln & Trp>Gln	3	1,0	1	0,6	2	1,9
					0	0,0

Prueba exacta de Fisher: * Indice <0,05; Fila 1 P = 0,046; TT frente a CT 0,029; Fila 2 P = 0,441; Fila 3 P = 0,314; Fila 4 P = 0,0005;
 Fila 5 P = 0,0001; Fila 6 P = 0,05; Fila 7 P = <0,0001; Fila 8 P = <0,0001; Fila 9 P = 0,0009; Fila 10 P<0,0001; Fila 11 P = 0,0001;
 Fila 12 P = 0,519

FIG. 26

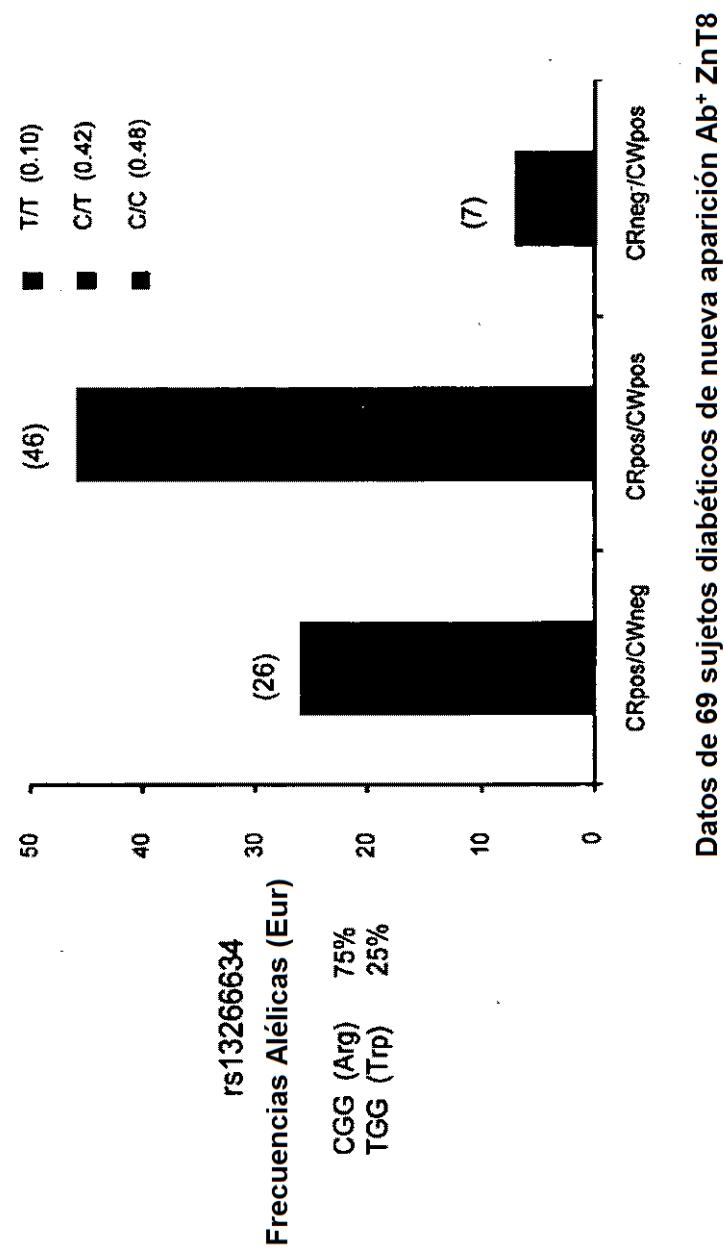


FIG. 27

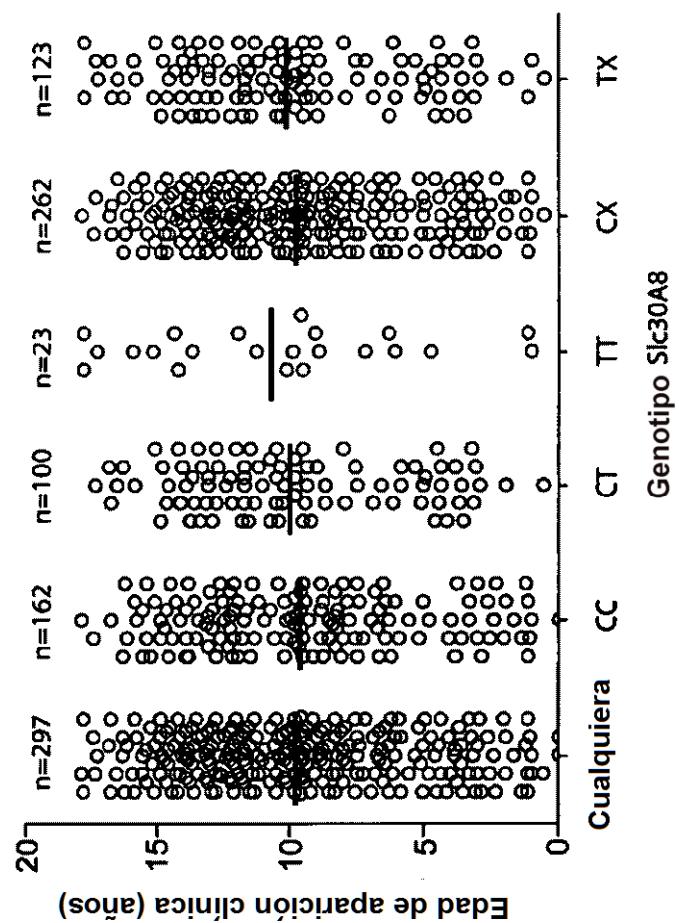


FIG. 28A

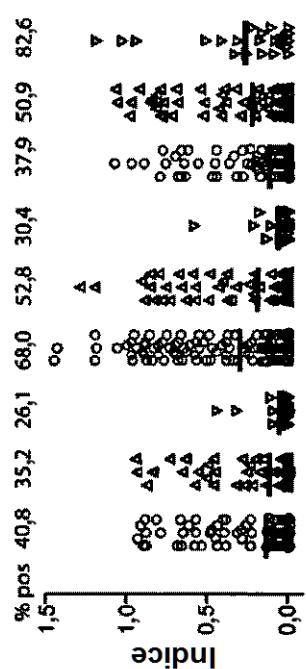


FIG. 28B

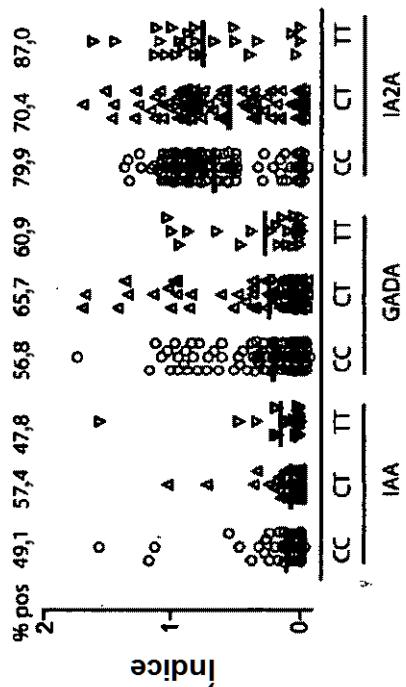


FIG. 29

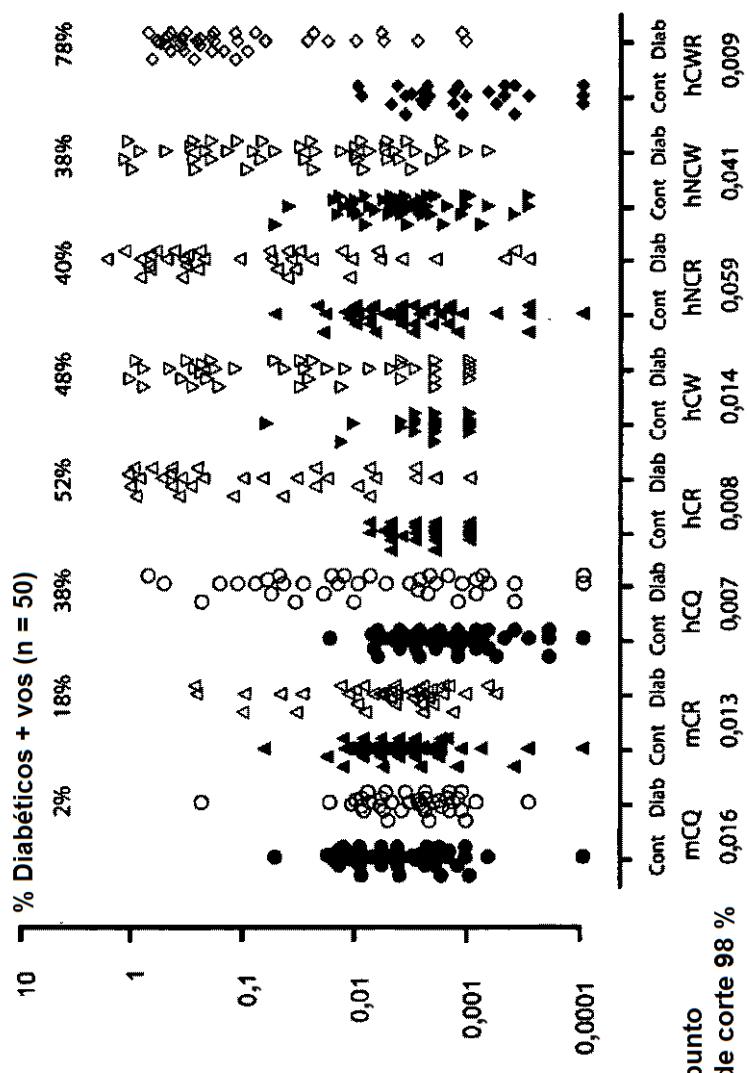


FIG. 30

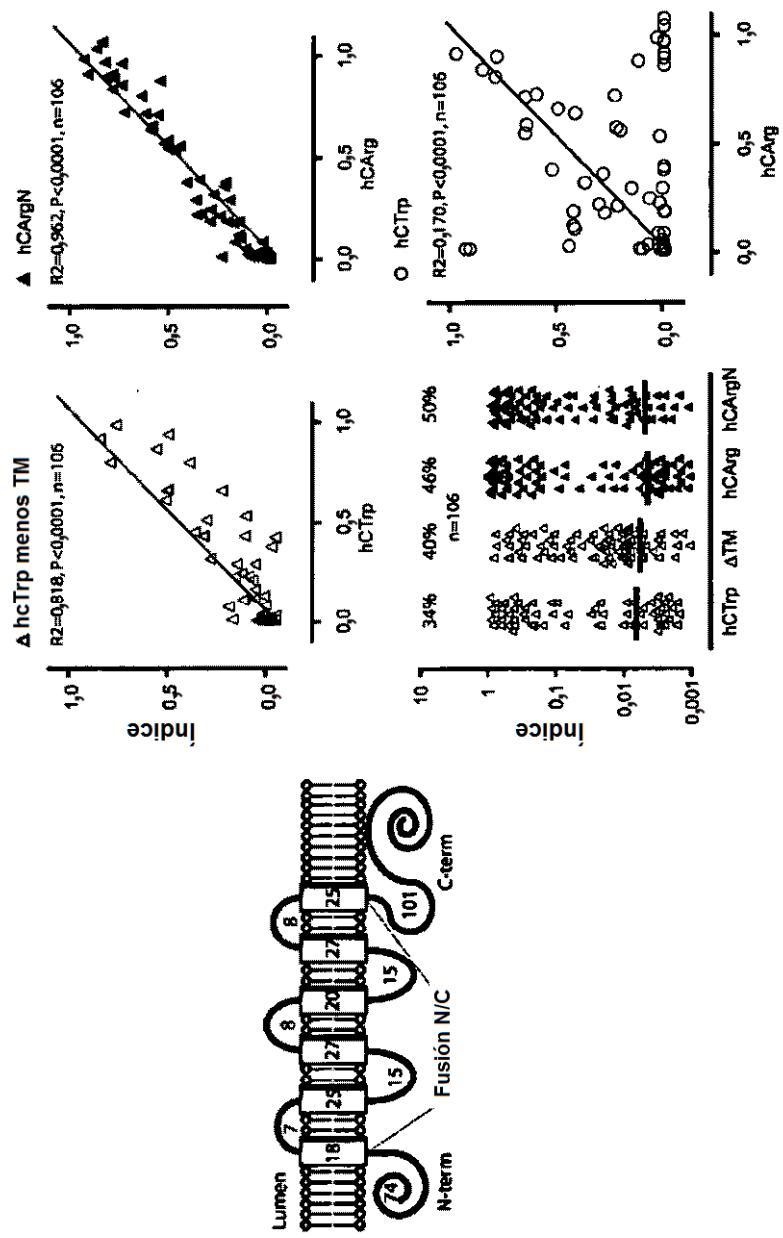


FIG. 31A

Paralelo (9/19 casos)

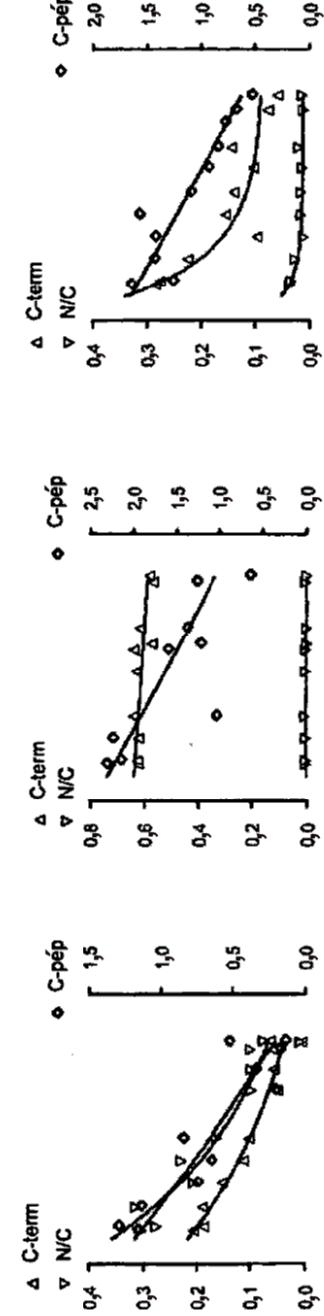


FIG. 31B

ZnTA más lento (7/19 casos)

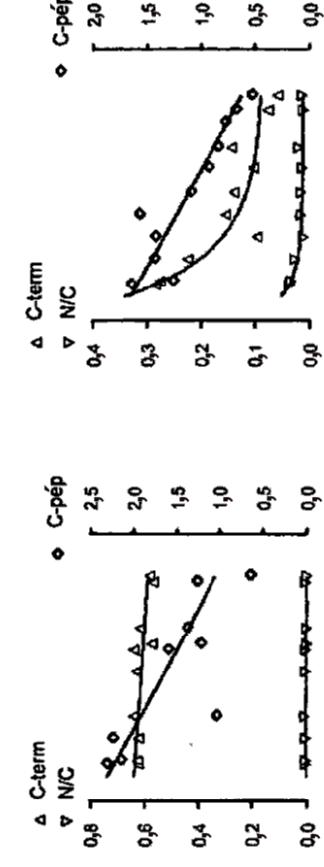
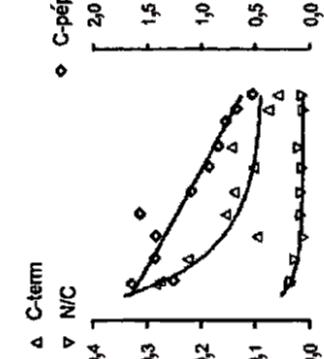


FIG. 31C

ZnTA más rápido (2/19 casos)

FIG. 31D
Días después de la aparición

Días después de la aparición

FIG. 31E
Días después de la aparición

Días después de la aparición

FIG. 31F

Días después de la aparición

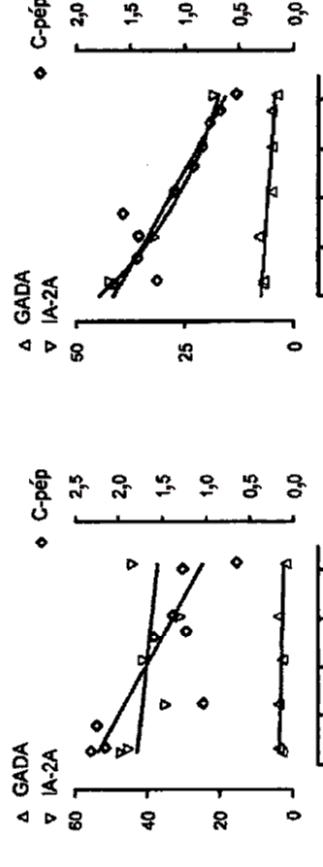
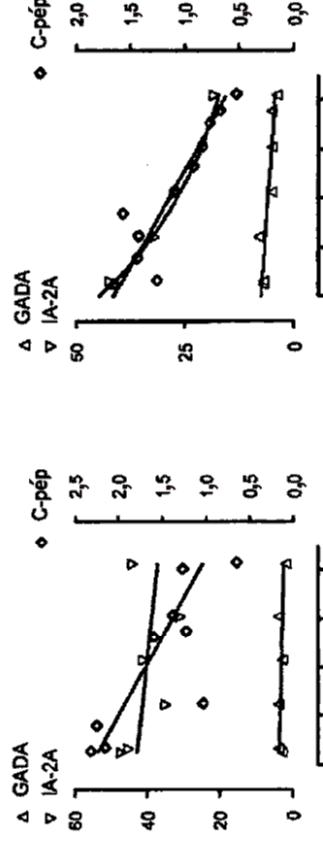
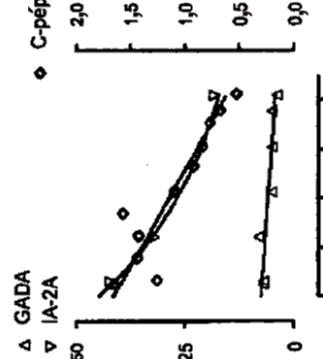


FIG. 32

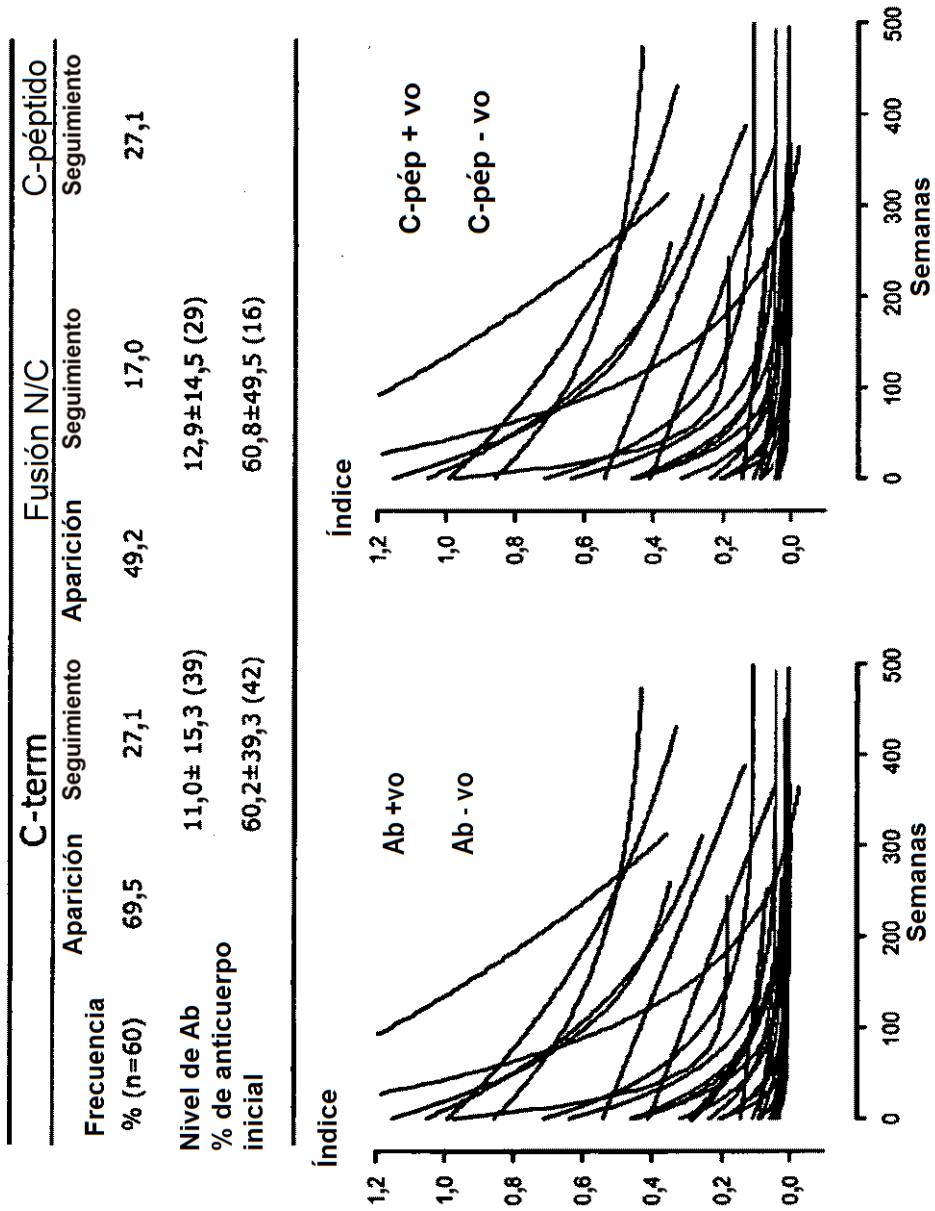


FIG. 33A

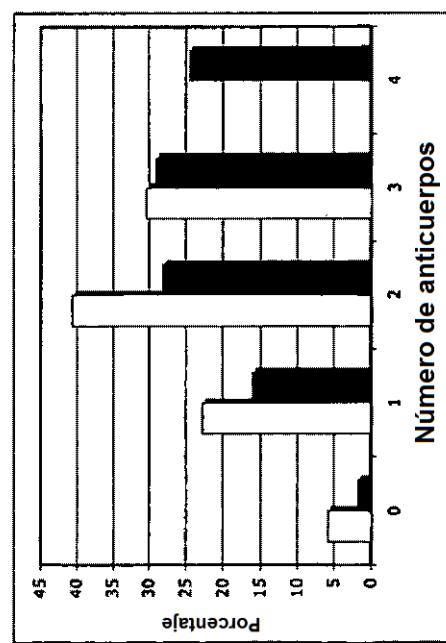


FIG. 33B

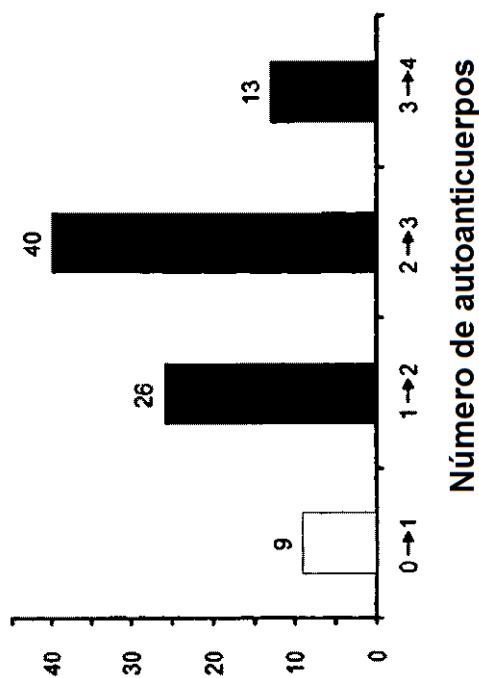


FIG. 34

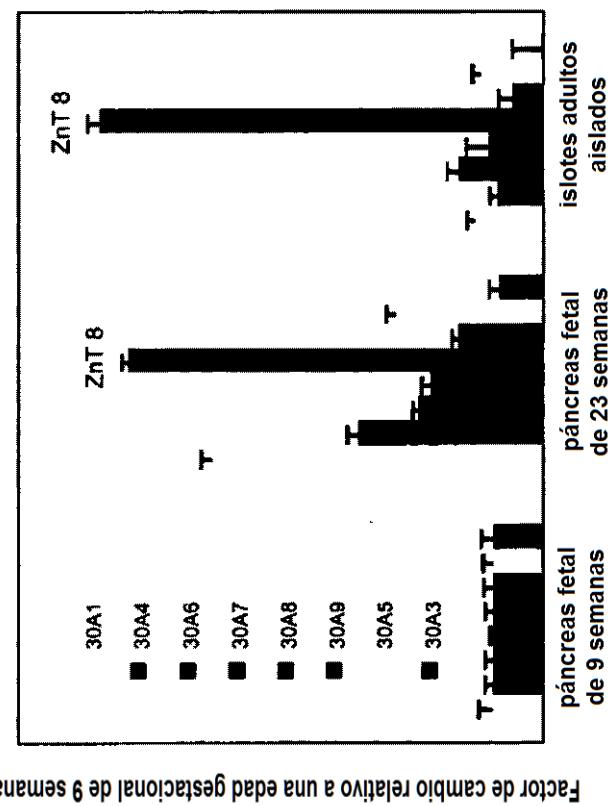


FIG. 35

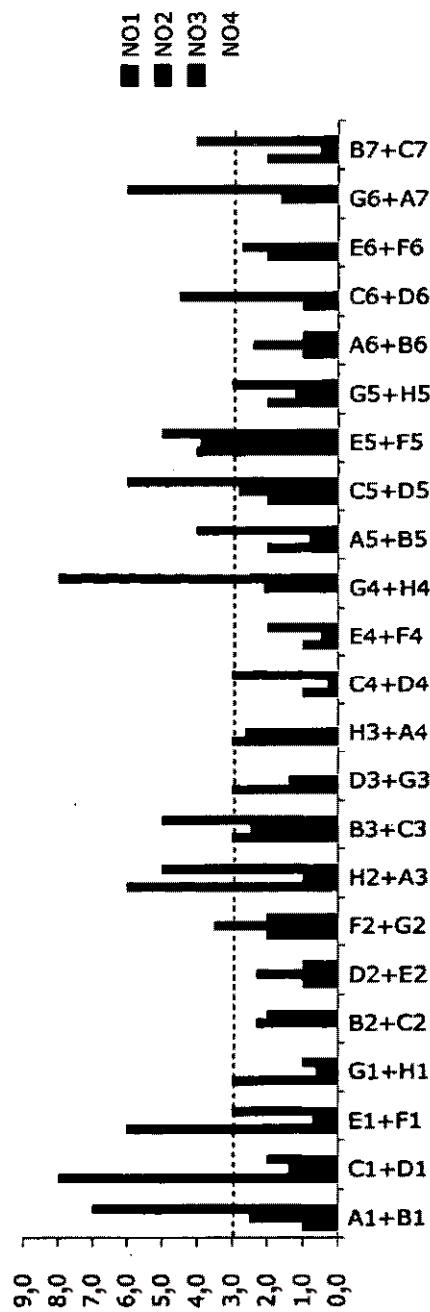


FIG. 36

