



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104854130 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201380065041. 2

C12N 15/12(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 10. 31

C07K 16/18(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/721, 322 2012. 11. 01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 06. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/067771 2013. 10. 31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/071015 EN 2014. 05. 08

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 T·甘茨 E·内梅特 L·考茨

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王健

(51) Int. Cl.

C07K 14/435(2006. 01)

C07K 7/08(2006. 01)

权利要求书3页 说明书20页

序列表8页 附图15页

(54) 发明名称

ERYTHROFERRONE 和 ERFE 多肽以及调控铁代谢的方法

(57) 摘要

本文公开了能够在受试者中调控铁调素量的多肽。也公开了治疗铁代谢的疾病和病症的组合物和方法。

1. 一种经分离的、经纯化的、合成和 / 或重组多肽,其包含与

EFQLLKLGAVRQRERAEPEPCTCGPAGPVAASLAPVSATAGEDDDDDVVGDVLALLAAPLAPGPRAPRVEAA
FLCRLRRDALVERRALHELGVYYLPDAEGAFRRGPGLNLTSGQYRAPVAGFYALAATLHVALGEPPRRGPPRRDH
LRLLCIQSRCQRNASLEAIMGLESSSELFTISVNGVLYLQMGQWTSVFLDNASGCSLTVRSGSHFSVLLGV (SEQ
ID NO:16) 具有约 95-100%序列同一性的 C- 末端序列。

2. 根据权利要求 1 所述的多肽,其并且还包含与

MAPARRPAGARLLL VYAGLLAAAAAGLSPEPGAPSRSRARREPPPGNELPRGPGESRAGPAARPPEPTAERA
HSVDPRDAWMLFVRQSDKG VNGKKRSRGKAKKLKFGLPGPPGPPGPQGGPGPIIPPEALLK (SEQ ID NO:17)

具有约 70-100%序列同一性的 N- 末端序列。

3. 一种经分离的、经纯化的、合成和 / 或重组多肽,所述多肽基本上由以下序列组成或者由以下序列组成:与

EFQLLKLGAVRQRERAEPEPCTCGPAGPVAASLAPVSATAGEDDDDDVVGDVLALLAAPLAPGPRAPRVEAA
FLCRLRRDALVERRALHELGVYYLPDAEGAFRRGPGLNLTSGQYRAPVAGFYALAATLHVALGEPPRRGPPRRDH
LRLLCIQSRCQRNASLEAIMGLESSSELFTISVNGVLYLQMGQWTSVFLDNASGCSLTVRSGSHFSVLLGV (SEQ
ID NO:16) 具有约 95-100%序列同一性的 C- 末端序列和与

MAPARRPAGARLLL VYAGLLAAAAAGLSPEPGAPSRSRARREPPPGNELPRGPGESRAGPAARPPEPTAERA
HSVDPRDAWMLFVRQSDKG VNGKKRSRGKAKKLKFGLPGPPGPPGPQGGPGPIIPPEALLK (SEQ ID NO:17) 具
有约 70-100%序列同一性的 N- 末端序列。

4. 一种经分离的、经纯化的、合成和 / 或重组多肽,其与

MAPARRPAGARLLL VYAGLLAAAAAGLSPEPGAPSRSRARREPPPGNELPRGPGESRAGPAARPPEPTAE
RAHSVDPRDAWMLFVRQSDKG VNGKKRSRGKAKKLKFGLPGPPGPPGPQGGPGPIIPPEALLKEFQLLKLGAVRQR
ERAEPEPCTCGPAGPVAASLAPVSATAGEDDDDDVVGDVLALLAAPLAPGPRAPRVEAAFLCRLRRDALVERRALHEL
GVYYLPDAEGAFRRGPGLNLTSGQYRAPVAGFYALAATLHVALGEPPRRGPPRRDHLRLLCIQSRCQRNASLEAI
MGLESSSELFTISVNGVLYLQMGQWTSVFLDNASGCSLTVRSGSHFSVLLGV (SEQ ID NO:1) 或者

MASTRPVGARTLLACASLLAAMGLGVPESAEPVGTHARPQPPGAELPAPPANSPPEPTIAHAHSVDPRDA
WMLFVKQSDKGINSKRRSKARRKLGLPGPPGPPGPQGGPGPIIPSEVLLKEFQLLKLGAVRQRESHLEHCTRDLT
TPASGSPSRVPAQELDSQDPGALLALLAATLAQGPAPRVEAAFHCRRLRDVQVDRRALHELGIYYLPEVEGAFHR
GPGLNLTSGQYTAPVAGFYALAATLHVALTEQPRKGPTPRDRRLRLLCIQSLCQHNASLETVMGLENSSELFTISV
NGVLYLQAGHYTSVFLDNASGSSLTVRSGSHFSAILLGL (SEQ ID NO:2) 具有约 70 至 100%的序列同
一性。

5. 根据权利要求 4 所述的多肽,其中所述多肽包含至少一条以下序列、基本上由至少
一条以下序列组成或者由至少一条以下序列组成:

GLPGPPGPPGPQGGPGP (SEQ ID NO:3),

AHSVDPRDAWMLFV (SEQ ID NO:4),

AHSVDPRDAWMLFVXQSDKGXN (SEQ ID NO:5),

LLKEFQLLKLGAVRQRE (SEQ ID NO:6),

GPRAPRVEAAF (SEQ ID NO:7),

VXRRALHELGXYYLPX (SEQ ID NO:8),

GLNLTSGQY (SEQ ID NO:9),

APVAGFYALAATLHVAL (SEQ ID NO:10),
XMGLEXSSELFTISVNGVLYLQ (SEQ ID NO:11),
SSELFTISVNGVLYLQ (SEQ ID NO:12),
TSVFLDNASG (SEQ ID NO:13),
SLTVRSGSHFSA (SEQ ID NO:14), 和
SLTVRSGSHFSAXLLGX (SEQ ID NO:15),
其中 X 为任何氨基酸。

6. 一种经分离的、经纯化的、合成和 / 或重组多肽, 其包含以下序列、基本上由以下序列组成或者由以下序列组成: GLPGPPGPPGPQGPPGP (SEQ ID NO:3),

AHSVDPRDAWMLFV (SEQ ID NO:4),
AHSVDPRDAWMLFVXQSDKGXN (SEQ ID NO:5),
LLKEFQLLLKGAVRQRE (SEQ ID NO:6),
GPRAPRVEAAF (SEQ ID NO:7),
VXRRALHELGXYYLPX (SEQ ID NO:8),
GLNLTSGQY (SEQ ID NO:9),
APVAGFYALAATLHVAL (SEQ ID NO:10),
XMGLEXSSELFTISVNGVLYLQ (SEQ ID NO:11),
SSELFTISVNGVLYLQ (SEQ ID NO:12),
TSVFLDNASG (SEQ ID NO:13),
SLTVRSGSHFSA (SEQ ID NO:14), 和
SLTVRSGSHFSAXLLGX (SEQ ID NO:15),
其中 X 为任何氨基酸。

7. 一种经分离的、经纯化的、合成和 / 或重组多肽, 其包含以下残基、基本上由以下残基组成或者由以下残基组成: 至少约 10、至少约 11、至少约 12、至少约 13、至少约 14、至少约 15、至少约 16、至少约 17、至少约 18、至少约 19、至少约 20、至少约 21、至少约 22、至少约 23、至少约 24 或至少约 25 个根据权利要求 4 所述的连续氨基酸残基。

8. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的多肽, 其中所述多肽降低在人受试者中的肝铁调素 mRNA 和 / 或血清铁调素水平。

9. 根据权利要求 1-6 所述的多肽, 其中其表现出与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的 erythroferrone 活性相同或者基本上类似的 erythroferrone 活性。

10. 根据权利要求 1-6 所述的多肽, 其中所述多肽表现出由 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 提供的 erythroferrone 活性的约 60-100%、约 70-100%、约 80-100%、约 90-100% 或约 95-100% 的 erythroferrone 活性。

11. 一种经分离的、经纯化的、合成和 / 或重组核酸分子, 其包含编码根据权利要求 1-10 中任一项所述的多肽的序列、基本上由编码根据权利要求 1-10 中任一项所述的多肽的序列组成或者由编码根据权利要求 1-10 中任一项所述的多肽的序列组成。

12. 一种重组细胞, 其能够表达根据权利要求 1-10 中任一项所述的多肽和 / 或包含根据权利要求 11 所述的核酸分子。

13. 一种抗体, 其针对根据权利要求 1-10 中任一项所述的多肽产生。

14. 一种组合物,其包含以下物质、基本上由以下物质组成或者由以下物质组成:根据权利要求 1-10 中任一项所述的多肽和 / 或根据权利要求 11 的核酸分子和 / 或根据权利要求 13 所述的抗体。

15. 一种在受试者中治疗铁代谢疾病的方法,其包括以下步骤、基本上由以下步骤组成或者由以下步骤组成:向所述受试者施用至少一种根据权利要求 1-10 中任一项所述的多肽、根据权利要求 11 所述的核酸分子、根据权利要求 13 的所述抗体或者根据权利要求 14 所述的组合物。

16. 权利要求 15 所述的方法,其中所述铁代谢疾病是铁超负荷疾病或者与异常低水平的铁调素相关的疾病和 / 或病症。

17. 权利要求 15 所述的方法,其中向所述受试者施用的至少一种多肽为 -ERFE 多肽。

18. 权利要求 15 所述的方法,其中所述铁代谢疾病是与异常低水平的铁和 / 或异常高水平的铁调素相关的疾病或病症。

19. 权利要求 15 所述的方法,其中向所述受试者施用的至少一种多肽为 +ERFE 多肽。

20. 一种在受试者中治疗铁代谢疾病的方法,其包括以下步骤、基本上由以下步骤组成或者由以下步骤组成:通过向所述受试者施用有效量的 ERFE 多肽来调控所述受试者中铁调素的量。

21. 根据权利要求 15-20 中任一项所述的方法,并且其还获得在施用之前、之中或之后所述受试者中一种或多种 ERFE 多肽和 / 或铁调素的量的测量值。

22. 权利要求 21 所述的方法,其中用测定来测量 ERFE 多肽的量,所述测定使用一种或多种根据权利要求 11 所述的核酸分子和 / 或一种或多种根据权利要求 13 所述的抗体。

23. 权利要求 21 所述的方法,并且其还包括向所述受试者施用铁调素的测量值高于正常值时的一种或多种 +ERFE 多肽或者铁调素的测量值低于正常值时的一种或多种 -ERFE 多肽。

24. 一种用于检测样品中 ERFE 多肽的存在和 / 或测量样品中 ERFE 多肽的量的测定,所述测定包括使所述样品与根据权利要求 13 所述的抗体接触,然后检测结合抗体的存在和 / 或测量结合抗体的量。

25. 一种试剂盒,其包括与试剂、装置、指导材料或者其组合一起包装的至少一种根据权利要求 1-10 中任一项所述的多肽、根据权利要求 11 所述的核酸分子、根据权利要求 12 所述的重组细胞、根据权利要求 13 所述的抗体或者根据权利要求 14 所述的组合物。

26. 一种杂交瘤细胞系,其能够表达根据权利要求 13 所述的抗体。

27. 一种复合物,其包含结合抗体的至少一种根据权利要求 1-10 中任一项所述的多肽,其中所述至少一种多肽和 / 或所述抗体通过重组技术制备。

28. 一种或多种根据权利要求 1-10 中任一项所述的多肽、根据权利要求 11 所述的核酸分子、根据权利要求 13 所述的抗体或者根据权利要求 14 所述的组合物在制备用于治疗铁代谢疾病的药剂中的用途。

29. 一种或多种根据权利要求 1-10 中任一项所述的多肽、根据权利要求 11 所述的核酸分子、根据权利要求 13 所述的抗体或者根据权利要求 14 所述的组合物用于治疗铁代谢疾病。

ERYTHROFERRONE 和 ERFE 多肽以及调控铁代谢的方法

[0001] 经由 EFS-WEB 提交的序列表的引用

[0002] 大小为 14.3kb 的创建于 2013 年 10 月 28 日且与本申请一起经由 EFS-Web 电子提交的、名称为“20131031_034044_119W01_seq_ST25”的序列表的 ASCII 文本文件的内容通过引用方式整体并入本文中。

[0003] 对于政府支持的致谢

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 的国立糖尿病消化与肾脏疾病研究所 (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NIDDK) 授予的资助号 R01 DK082717 和 R01 DK 065029 的政府支持下完成的。政府对本发明拥有一定的权利。

[0005] 发明背景

1. 发明领域

[0006] 本发明涉及调控铁代谢的多肽以及制备和使用该多肽的方法。

[0007] 2. 相关领域的描述

[0008] 红细胞生成目前为止是机体内铁的主要消耗者。尤其已经由 Finch 等人在 50 年多年以前提出存在响应红细胞生成需求而调控铁的激素。参见 Finch 1994。令人遗憾的是, Finch 和其它人从未发现任何此类激素。

[0009] 其它研究者研究了在地中海贫血中铁吸收增加的原因, 并且提出两种物质 GDF15 和 TWSG1 可导致该疾病中铁调素抑制和铁超负荷, 但推论这并不是铁吸收的生理信号。参见 Tanno 2010b 和 Casanovas2013。GDF15 或 TWSG1 在地中海贫血的铁超负荷中的作用从未具体说明。

[0010] 发明概述

[0011] 在一些实施方案中, 本发明涉及经分离的、经纯化的、合成和 / 或重组多肽, 该多肽包含与 SEQ ID NO:16 具有约 95-100%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98% 或至少约 99% 序列同一性的 C-末端序列。在一些实施方案中, 所述多肽包含与 SEQ ID NO:17 具有约 70-100%、至少约 80%、至少约 90% 或至少约 95% 序列同一性的 N-末端序列。在一些实施方案中, 本发明涉及经分离的、经纯化的、合成和 / 或重组多肽, 该多肽基本上由以下序列组成或者由以下序列组成: 与 SEQ ID NO:16 具有约 95-100%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98% 或至少约 99% 序列同一性的 C-末端序列和与 SEQ ID NO:17 具有约 70-100%、至少约 80%、至少约 90% 或至少约 95% 序列同一性的 N-末端序列。在一些实施方案中, 本发明涉及经分离的、经纯化的、合成和 / 或重组多肽, 该多肽与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 具有约 70 至 100%、至少约 80%、至少约 90% 或至少约 95% 序列同一性。在一些实施方案中, 本发明涉及经分离的、经纯化的、合成和 / 或重组多肽, 该多肽包含至少一种以下序列、基本上由至少一种以下序列组成或者由至少一种以下序列组成: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:15, 其中 X 为任何氨

氨酸。在一些实施方案中,本发明涉及经分离的、经纯化的、合成和 / 或重组多肽,该多肽包含所有以下序列、基本上由所有以下序列组成或者由所有以下序列组成:SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:15, 其中 X 为任何氨基酸。在一些实施方案中,当向人受试者施用,本发明的多肽降低在人受试者中的肝铁调素 mRNA 和 / 或血清铁调素水平。在一些实施方案中,本发明的多肽表现出与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的 erythroferrone 活性相同或者基本类似的 erythroferrone 活性。在一些实施方案中,本发明的多肽表现出由 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 提供的 erythroferrone 活性的约 60-100%、约 70-100%、约 80-100%、约 90-100% 或约 95-100% 的 erythroferrone 活性。

[0012] 在一些实施方案中,本发明涉及经分离的、经纯化的、合成和 / 或重组多肽,该多肽包含以下残基、基本上由以下残基组成或者由以下残基组成:至少约 10、至少约 11、至少约 12、至少约 13、至少约 14、至少约 15、至少约 16、至少约 17、至少约 18、至少约 19、至少约 20、至少约 21、至少约 22、至少约 23、至少约 24 或至少约 25 个 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:16 的连续氨基酸残基。

[0013] 在一些实施方案中,使用合成或重组技术来制备本发明的多肽。

[0014] 在一些实施方案中,本发明涉及经分离的、经纯化的、合成和 / 或重组核酸分子,该核酸分子包含编码根据本发明所述的多肽的序列、基本上由编码根据本发明所述的多肽的序列组成或者由编码根据本发明所述的多肽的序列组成。

[0015] 在一些实施方案中,本发明涉及重组细胞,该重组细胞能够表达根据本发明所述的多肽和 / 或包含编码根据本发明所述的多肽的核酸分子。

[0016] 在一些实施方案中,本发明涉及抗体,该抗体针对根据本发明所述的多肽产生。所述抗体可以为单克隆抗体。在一些实施方案中,所述抗体为人源化抗体、嵌合抗体或人抗体。

[0017] 在一些实施方案中,本发明涉及组合物,该组合物包含以下物质、基本上由以下物质组成或者由以下物质组成:根据本发明所述的多肽和 / 或编码根据本发明所述的多肽的核酸分子和 / 或针对根据本发明所述的多肽产生的抗体。在一些实施方案中,所述组合物以比在正常受试者中存在的浓度更高的浓度包含根据本发明所述的多肽和 / 或编码根据本发明所述的多肽的核酸分子和 / 或针对根据本发明所述的多肽产生的抗体。

[0018] 在一些实施方案中,本发明涉及在受试者中治疗铁代谢疾病的方法,该方法包括以下步骤、基本上由以下步骤组成或者由以下步骤组成:施用至少一种根据本发明所述的多肽、编码根据本发明所述的多肽的核酸分子、针对根据本发明所述的多肽产生的抗体或者包含根据本发明所述的多肽的组合物。在一些实施方案中,所述受试者为人。在一些实施方案中,所述受试者需要该方法。如本文所使用,“有需要的受试者”是已经被诊断具有或患有铁代谢疾病的受试者。在一些实施方案中,铁代谢疾病是铁超负荷疾病或者与异常低水平的铁调素相关的疾病和 / 或病症。在一些实施方案中,铁代谢疾病是与异常低水平的铁和 / 或异常高水平的铁调素相关的疾病或病症。在一些实施方案中,向受试者施用的多肽为 -ERFE 多肽。在一些实施方案中,向受试者施用的多肽为 +ERFE 多肽。在一些实施方案中,施用有效量、优选治疗有效量的一种或多种多肽。在一些实施方案中,该方法包括以

下步骤、基本上由以下步骤组成或者由以下步骤组成：通过向受试者施用有效量、优选治疗有效量的 ERFE 多肽来调控在受试者中铁调素的量。在一些实施方案中，该方法包括测量在施用之前、之中或之后在受试者中的一种或多种 ERFE 多肽和 / 或铁调素的量。在一些实施方案中，使用测定来测量 ERFE 多肽的量，该测定使用编码根据本发明所述的多肽的一种或多种核酸分子和 / 或针对根据本发明所述的多肽产生的一种或多种抗体。在一些实施方案中，该方法包括向受试者施用铁调素的测量值高于正常值时的一种或多种 +ERFE 多肽或者铁调素的测量值低于正常值时的一种或多种 - ERFE 多肽。

[0019] 在一些实施方案中，本发明涉及测定，该测定用于检测在样品中 ERFE 多肽的存在和 / 或测量在样品中 ERFE 多肽的量，该测定包括使样品与针对根据本发明所述的多肽产生的抗体接触，然后检测结合抗体的存在和 / 或测量结合抗体的量。

[0020] 在一些实施方案中，本发明涉及试剂盒，该试剂盒包括与试剂、装置、指导材料或者其组合一起包装的至少一种根据本发明所述的多肽、编码根据本发明所述的多肽的核酸分子、如本文所公开的重组细胞、针对根据本发明所述的多肽产生的抗体或者如本文所公开的组合物。

[0021] 在一些实施方案中，本发明涉及杂交瘤细胞系，该杂交瘤细胞系能够表达特异性识别根据本发明所述的多肽的抗体或者针对根据本发明所述的多肽产生的抗体。

[0022] 在一些实施方案中，本发明涉及复合物，该复合物包含结合抗体的至少一种根据本发明所述的多肽，其中所述至少一种多肽和 / 或抗体通过重组技术制备。

[0023] 在一些实施方案中，本发明涉及一种或多种根据本发明所述的多肽、编码根据本发明所述的多肽的核酸分子、针对根据本发明所述的多肽产生的抗体或者包含所述多肽、核酸分子和抗体中的一种或多种的组合物在制备治疗铁代谢疾病的药剂中的用途。

[0024] 在一些实施方案中，本发明涉及一种或多种根据本发明所述的多肽、编码根据本发明所述的多肽的核酸分子、针对根据本发明所述的多肽产生的抗体或者包含所述多肽、核酸分子和抗体中的一种或多种的组合物在治疗铁代谢疾病中的用途。

[0025] 发明详述

[0026] 前面的概述和以下的详述都仅为示例性和说明性，并且意在对本发明提供进一步的解释。附图被包括以进一步理解本发明并在此引入本说明书，并且组成本说明书的一部分、说明本发明的一些实施方案及与说明书一起用于解释本发明的原理。

[0027] 附图描述

[0028] 通过参考附图进一步理解本发明，其中：

[0029] 图 1：相对于未经处理的动物，在红细胞生成刺激（静脉抽血（实线）或 EPO 注射（虚线））之后肝 Hmp mRNA 受到抑制。使用 6 周龄雄性小鼠， $n = 4$ /组。 $*p < 0.05$ ， $**p < .01$ ， $***p < .001$ ，通过学生 t 检验与未经处理的动物比较。

[0030] 图 2：健康人志愿者对在第 2 天 9AM 时给予 EPO 5000U 的响应 (Ashby 2010)。

[0031] 图 3A-3B：ERFE 是 TNF- α 超家族的成员。图 3A：小鼠 (SEQ ID NO:2) 和人 ERFE 蛋白 (SEQ ID NO:1) 的比对。突出显示的序列是 SEQ ID NO:16。进行人 ERFE 的 C-末端区段与 TNF 家族的其它人成员和 ERFE 的人变体的彩色 CLUSTAL 比对。发现，ERFE 的人变体在信号序列上不同。因此，根据本发明所述的 ERFE 多肽包含与如 SEQ ID NO:16 所示的 N-末端区段的 90-100%，优选 95-100%，更优选 98-100% 和最优选 99-100% 序列同一性。

图 3B :基于与 TNF α 超家族其它成员类似性的 ERFE 的结构模型。

[0032] 图 4 :与未经处理的小鼠相比,在静脉抽血(实线)或 EPO 注射(虚线)之后骨髓 Erfe mRNA 增加倍数。使用 6 周龄小鼠, $n = 4$ /组。* $p < .001$, ** $p < .01$, 通过 t 检验与未经处理的动物比较。图 5 :人 ERFE 是在中幼红细胞中最大程度表达的红细胞系转录物。图 5A 显示在各种组织中按照强度顺序的相对的人 ERFE mRNA 表达。胎儿肝脏和骨髓,高水平表达人 ERFE mRNA 的器官,含有成红细胞。图 5B 基于人成红细胞成熟数据库 (Human Erythroblast Maturation Database, Merryweather-Clarke 2011)。显示了从红细胞类菌落形成单位 (CFU-E) (红细胞发育的极早期阶段) 到原成红细胞 (Pro-E)、中幼红细胞 (Int-E) 到晚幼红细胞 (LateE) 的成熟人成红细胞中人 ERFE mRNA 的相对表达。

[0033] 图 6 :通过 Socolovsky 方法 (Liu 2006) 分类为原成红细胞 (ProE) 和成红细胞 EryA、B、C 阶段的小鼠骨髓成红细胞中的 Erfe mRNA 表达。白柱表示来自在静脉抽血 0.5ml 之后 15 小时的 C57BL/6 小鼠的骨髓;而黑柱表示来自未经操作的对照小鼠的骨髓。六周龄雄性小鼠, $n = 3$ /组, * $p < 0.01$, 通过 t- 检验。

[0034] 图 7A-7C :在静脉抽血的 Erfe^{+/+}、Erfe^{+/-}和 Erfe^{-/-}小鼠(标记为 WT(野生型,图 7A)、HT(杂合体,图 7B)和 KO(敲除,图 7C))的肝脏中 Hamp mRNA 的改变。 $n = 3$ 至 6 只小鼠/组。与未行静脉抽血的对照相比, * $p < .001$, ** $p < .01$, 通过 t- 检验。

[0035] 图 8 :缺乏 Erfe 的小鼠显示从贫血中恢复延缓 (A 和 B)。与野生型小鼠相比(虚线),经静脉抽血的缺乏 Erfe 的小鼠(实线)显示出血红蛋白恢复延缓和较低的平均红细胞血红蛋白量 (MCH)。通过学生 t 检验比较 WT ($n = 17$) 和 KO ($n = 15$) 之间每次测量的血液参数 (A, B)。在没有性别差异的情况下,将每一参数的两种性别合并。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0036] 图 9A-9C :图 9A :用 0.5 或 1 μ g 质粒 DNA 转染的 HEK293T 细胞,该质粒 DNA 编码融合到 C-末端 6His 标记的小鼠 Erfe cDNA。使用抗 -6His 抗体的蛋白质印迹检测到 Erfe 主要在上清液中,这表明分泌了大量的 Erfe。图 9B :分泌的 Erfe 为 N- 和 O- 糖基化的。图 9C :在蛋白质印迹中针对内部肽序列 PSRVPAQEL (SEQ ID NO:18) 产生的兔抗小鼠抗 -Erfe 抗体 2 检测重组蛋白,其中 +/- 表明经 Erfe 质粒转染或不经 Erfe 质粒转染。

[0037] 图 10 :Erfe 直接作用于肝脏来抑制铁调素。(A, B, C) 使用小鼠重组 Erfe (2 μ g/g) 或盐水经腹腔处理六只 C57BL/6 雄性小鼠,并在 15 小时之后分析。肝铁调素 mRNA (A) 和血清铁调素 (B) 水平均显著受到 Erfe 处理抑制,尽管肝脏 Saa1 mRNA 表达 (C) 增加表明出现了炎症反应。(D, E, F) 使用编码 GFP 或小鼠 Erfe cDNA 序列的慢病毒来转导八只 7 周龄 C57BL/6 雄性小鼠。(D) 在用 Erfe 慢病毒转导的小鼠的肝脏中 Erfe mRNA 表达仅轻度增加(与使用红细胞生成刺激的小鼠骨髓中 32 倍上调相比,仅为基线骨髓水平的 2 倍),但是该增加足以降低肝铁调素 mRNA (E) 和血清铁调素 (F) 水平。(G) 如通过使用抗 -FLAG 抗体的蛋白质印迹检测到,通过使用 Erfe 慢病毒感染的 HEK293T 细胞分泌重组小鼠 Erfe。(H) 使用来自对照细胞或者过表达 Erfe 的 HEK293T 细胞的上清液 (50% v/v) 对小鼠原代肝细胞处理表明 Erfe 直接作用于肝脏以抑制铁调素 mRNA 表达。显示了一式三份经 15 小时处理的 3 个独立实验的平均值 $\pm$ SEM。通过 qRT-PCR 来测量铁调素 (Hamp)、血清淀粉样蛋白 1 (Saa1) 和 Erfe mRNA (Erfe) 水平。显示 $-\Delta Ct$ (即, $Ct \text{ Hprt} - Ct \text{ Hamp}$, $Saa1$ 或 $Erfe$) 的平均值 $\pm$ SEM。通过酶联免疫吸附测定来测量血清铁调素水平 (B, F)。通过学生 t 检验

来比较经处理的小鼠和对照小鼠之间或者经 Erfe 处理的样品和对照样品之间的平均值。
*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0038] 图 11:与野生型小鼠 (WT) ($n = 5$) 相比,在中间型 β -地中海贫血 th3/+ 小鼠 (thal) ($n = 4$) 的骨髓和脾脏中 Erfe mRNA 增加。使用 6 月龄雄性小鼠。* $p = 0.016$, ** $p < 0.001$ 。将 Hprt 用作参考基因。

[0039] 图 12:Erfe 的预测结构结构域。SP = 信号肽;NTD = N-末端结构域 1 和 2。

[0040] 发明详述

[0041] 本发明基于在本文中被称为“Erythroferrone”的蛋白的发现。Erythroferrone 开始被鉴定为在受试者中介导红细胞生成以及铁吸收和分布的“激素”。Erythroferrone 在受试者的骨髓中生成,并且当红细胞受到刺激时(例如在出血之后或者从贫血中恢复时)它的产量会急剧增加。Erythroferrone 调控铁的供应以满足骨髓中红细胞生成的需求。具体而言,发现 erythroferrone 作用于肝脏来抑制主要的铁调控蛋白(铁调素)的生成。因此,erythroferrone 过量生成可导致疾病(例如 β -地中海贫血)中铁超负荷,因而拮抗 erythroferrone 可用于治疗 β -地中海贫血。

[0042] Erythroferrone 是在抑制铁调素表达的因子的研究中发现的。铁调素,一种由肝脏合成的 25 个氨基酸的肽激素,为铁稳态的主要调控剂。参见 Ganz 2011。铁调素通过结合至唯一的铁输送者膜铁转运蛋白(ferroportin)起作用,从而导致膜铁转运蛋白在溶酶体中泛素化、内在化和降解。当膜铁转运蛋白从细胞膜消失时,饮食吸收受到抑制,并且循环的铁在巨噬细胞中发生螯合,这降低了红细胞生成中铁的利用率。相比之下,铁调素低使得膜铁转运蛋白可以在输送铁到血浆的细胞中保持活性,从而使得更多铁可用于血红蛋白合成。铁、炎症或 ER 应激刺激铁调素生成,而缺氧、缺铁和红细胞生成活性增加会抑制铁调素生成。

[0043] 在出血或促红细胞生成素(EPO)施用之后铁调素受到抑制。铁调素在由出血、溶血或缺铁导致的贫血中或者在红细胞生成无效的遗传性贫血中降低。在红细胞生成无效的疾病中红细胞生成对铁调素的抑制作用特别显著,在该疾病中红细胞前体大量扩张,但是大部分在成红细胞阶段经历细胞凋亡而不是成熟为红细胞。因此,在 C57BL/6 小鼠中,检测铁调素 mRNA 对出血(500 μ L)或 EPO 注射(200U)响应的时程,并且观察到在 9 至 15 小时内肝铁调素 mRNA 的显著抑制。在红细胞生成刺激之后 12-15 小时,抑制最大为约 90%(图 1)。响应时机与人志愿者中时机相类似,在人志愿者中,降低出现在 9-24 小时(图 2)。

[0044] 该小鼠出血响应时程的体内数据揭示:转录因子核心元件结合蛋白 α (C/EBP α) mRNA 和肝脏中蛋白水平都未改变,尽管可观察到铁调素的有效抑制。在 EPO 施用之后铁调素的抑制也不是由于铁利用增加,因为铁调素显著降低发生在转铁蛋白饱和或其它已知铁相关的参数发生任何改变之前(图 2)。因此,响应于对贫血或者其它缺氧刺激,高水平的 EPO 通过以下过程间接引起铁调素抑制:诱导一种或多种红细胞类因子从骨髓分泌,所述一种或多种红细胞类因子继而作用于肝脏以抑制铁调素表达和增加铁由饮食吸收和储存递送。在 EPO 注射之后铁调素的早期抑制可使得更多铁可用于通过红细胞前体快速摄取,并且加速红细胞生成。

[0045] 因此,使用可商购获得的基于基因芯片的表达谱(AffymetrixMouse Gene 1.0ST Array)来研究在骨髓中响应出血的基因表达谱(0-48 小时)。也可通过包括在本领域中称

为“RNA Seq”的 cDNA 下一代测序的可替代方法完成表达谱。在其表达在铁调素 mRNA 抑制之前被诱导并且在铁调素水平回到正常基线之前保持在较高水平的红细胞类特异性转录物之中,存在一种作为 Fam132b 在各种公开序列数据库中列出的编码分泌蛋白的之前未表征的孤儿转录物。发现 Fam132b mRNA 在铁调素抑制之前,在出血之后 4 个小时内可被高度诱导。Erythroferrone 是一种由 Fam132b mRNA 编码的蛋白。

[0046] 如本文所使用,除了指代“ERFE 多肽”(ERFE 和 -ERFE 多肽)和“ERFE 多核苷酸”之外,“ERFE”(所有均为大写字母并斜体)是指编码 erythroferrone 的人基因;“Erfe”(首字母大写且斜体)是指编码 erythroferrone 的小鼠基因;“ERFE”(所有均为大写字母且非斜体)是指人蛋白 erythroferrone;并且“Erfe”(首字母大写且非斜体)是指小鼠蛋白 erythroferrone。

[0047] Erythroferrone 是 TNF α 超家族的成员 - Erythroferrone 同源物的氨基酸序列在脊椎动物进化中相当保守,因而小鼠和人蛋白约 71% 相同(图 3A),并且一半 C-末端与斑马鱼同源物约 44% 相同。结构域分析表明:Erfe 是 TNF α 超家族的成员,它与已知细胞因子仅具有中等类似性。TNF α 和 RANK 配体(RANKL)为最亲近的相关物。搜索基因组和 mRNA 数据库鉴定了仅在信号序列上有区别的人 ERFE 的两种变体。仍然需要确定这两种变体是否均在骨髓中表达和两种变体是否产生具有不同表达水平或不同生物活性的蛋白。通过人胎儿肝脏来源的成红细胞的 mRNA 的逆转录和 cDNA 测序,确认了 C-末端 220 个氨基酸(图 3A 中突出显示)。

[0048] 使用 HHHPredictB 对整个蛋白结构建模(图 3B)表明:蛋白的 N-末端部分(左侧)由信号序列组成,之后为具有胶原样区段的开放区,并且 C-末端部分与 TNF α /RANKL(右侧)同源。与 TNF α 的类似性显著,因为 TNF α 抑制在原代肝细胞培养物中铁调素 mRNA。与 TNF α 的类似性预测具有形成多聚体的趋势。

[0049] 在骨髓中 Erythroferrone 表达响应 EPO - 使用 qPCR,证实在骨髓(图 4)中和在脾脏(数据未显示)中进行静脉抽血之后对 Erfe mRNA 表达的诱导,从而支持它参与红细胞生成。在 mice 中 EPO 注射导致与在静脉抽血的小鼠中在幅度和时程上可比较的铁调素抑制(图 1)。同样地,在骨髓和脾脏中 Erfe mRNA 对 EPO 的响应与通过静脉抽血导致的响应类似,但是在注射 EPO 的小鼠中 Erfe 刺激更早出现(图 4)。这与在静脉抽血模型中 EPO 的 Erfe 作用下游一致。

[0050] Erythroferrone 可能为由成红细胞产生的红系因子(erythrokine) - 对基因表达数据库的搜索揭示人 ERFE 在人骨髓和胎儿肝脏中高度表达(例如,图 5A),而在中幼红细胞中“体外”分化型人 CD34+ 细胞达到最大表达,它超过 CFU-E 增加了大约 8 倍(图 5B)。这表明成红细胞是 erythroferrone 的主要来源。用 0.5ml 静脉抽血之后 15 小时获得的离体小鼠骨髓直接验证这点,其显示与对照小鼠相比,在成红细胞中 Erfe 表达显著增加,主要在(早幼红细胞和中幼红细胞)EryA 和 B 阶段(图 6, qRT-PCR, Hprt 参考)。因为 EryB 阶段相对丰富,这些细胞可能构成骨髓中 Erfe 的主要来源。

[0051] 在 Erfe 敲除和单倍性不足的小鼠中铁调素对出血的响应 - 在混合的 Sv129/C57BL/6 背景(Fam132b^{tm1Lex}, Lexicon Pharmaceuticals)下的 Erfe^{+/-}小鼠以及使用标记辅助加速回交来回交到 C57BL/6 背景下的那些 Erfe 小鼠可用于进一步分析根据本发明所述的多肽。在一些实验中,将混合背景 Erfe^{-/-}和 Erfe^{+/-}与它们野生型(WT)同窝小鼠相

比。Erfe 敲除 (KO) 是可行的,表现出正常表型,具有完全正常和非常广泛的对 Lexicon 小鼠数据库进行的标准化后处理,而且它们可以生育。在 6 周龄 (但不是 3 周、12 周或 6 月) 使用自动血液分析仪 (Hemavet 850 ;Drew Scientific, Oxford, CT) 进行的全血细胞计数揭示与野生型和杂合体相比在缺乏 Erfe 的动物中血红蛋白基线水平降低。6 周龄是快速红细胞类扩增和生长的时期,对铁的需求很大,这与出血之后应激红细胞生成类似。为了测试 Erfe 是否为通过出血对铁调素抑制的关键介体,对 Erfe^{-/-}、Erfe^{+/-}和 Erfe^{+/+}同窝小鼠进行静脉抽血 (500 μ L),并且在静脉抽血之后 12、15、24 和 48 小时分析 (图 7A-7C)。Erfe^{-/-}小鼠不能降低肝铁调素 mRNA 表达,这表明 Erfe 对出血后快速铁调素抑制是必不可少的 (图 7A-7C)。单倍性不足小鼠仅显示在 12-15 小时部分响应,这表明铁调素对 Erfe 呈现剂量依赖性响应。

[0052] 缺乏 Erfe 的小鼠显示出从出血诱导的贫血中延缓的恢复—对十二周龄 Erfe^{+/+}和 Erfe^{-/-}静脉抽血,然后在 9 天内监测它们的恢复。缺乏 Erfe 的小鼠表现出与野生型对照相比较低的血红蛋白和平均红细胞血红蛋白量 (图 8),并且缺乏 Erfe 的小鼠从出血诱导的贫血中恢复延缓数天。

[0053] 重组蛋白产生和分析 - 构建编码具有 C-末端 Myc/Flag、V5 表位 /His、Myc/His 和 Flag/His 的小鼠和人 ERFE 的 cDNA 的多种表达质粒。经转染的 HEK293T 的蛋白质印迹证实分泌了所述蛋白 (图 9A)。将所述材料通过标记的亲和色谱来纯化,在 SDS-PAGE 上分析,并对应通过蛋白质印迹检测到的那些条带来识别主要条带。通过 HPLC-MS 对胰蛋白酶消化的片段的蛋白质组学分析来证实所述条带为 Fam132b/Erfe 条带。令人感兴趣的是,Erfe 的分泌形态具有比细胞形式稍高的分子量,并且两种蛋白为预期大小的两倍,这表明可能发生了二聚化。经纯化的分泌产物的去糖基化表明 Erfe 是 N- 和 O- 糖基化的 (图 9B)。Erfe 和 Erfe 多肽的重组形式可用于分析它们体外和体内活性。生成针对 Erfe 产生的抗体,以及可将这种抗体用于内源性蛋白检测 (图 9C),并且用于测定在受试者 (例如,患有铁病症的小鼠模型和患者) 中一种或多种 ERFE 多肽的血清浓度。在初始实验中,发现 HEK293 细胞系的一种变体高水平表达 Erfe,但是不能分泌它,从而表明分泌事件可以为细胞类型特异性的或者依赖细胞的专门特征。

[0054] 为了测试分泌的 erythroferrone 蛋白是否为铁调素的抑制剂,使用鼠重组 Erfe 注射 C57BL/6 雄性小鼠 (2 μ g/g)。发现,与盐水注射的小鼠相比,在 Erfe 处理 15 小时之后铁调素 mRNA 和血清蛋白水平显著降低 (图 10A, 10B),尽管出现如通过 Saa1mRNA 表达增加所示的通过重组蛋白触发的大量炎症反应 (图 10C)。炎症将增加铁调素表达。

[0055] 为了避免重组 Erfe 制剂的急性炎症作用,使用编码 Erfe 的基于慢病毒载体来转导 C57BL/6 雄性小鼠。三周之后,与使用对照慢病毒处理的小鼠相比,在使用 Erfe- 慢病毒处理的小鼠肝脏 (但不是骨髓) 中观察到 Erfe mRNA 适度增加 (图 10D)。然而,铁调素 mRNA 和血清水平分别显著降低 30 倍和 10 倍 (图 10E, 10F),这表明在肝脏中即使少量的 Erfe 也足以对铁调素转录产生抑制作用。因此,测试 Erfe 是否可直接作用于肝脏来调控铁调素。使用来自对照 HEK293T 或 HEK293T 过表达 Erfe 的 50% (v/v) 上清液来处理小鼠原代肝细胞 15 小时 (图 10G),导致在经 Erfe 处理的细胞中铁调素 mRNA 水平降低 4 倍 (图 10H)。总而言之,这些结果表明:erythroferrone 是铁调素的有效抑制剂,它可直接作用于肝脏以抑制铁调素 mRNA 表达。

[0056] 抗体的制备 - 为了便于检测和表征 erythroferrone, 可生成和使用在鼠和人形式的 erythroferrone 和 ERFE 多肽中针对肽抗原的一系列抗体。此外, 针对 erythroferrone 和 / 或 ERFE 多肽的内部和 N- 末端表位的抗体可用于根据本发明所述的各种测定和处理方法中。

[0057] 在地中海贫血小鼠中 Erfe 的大量增加 - Erythroferrone 过度产生可促进未输液的 β -地中海贫血的铁超负荷。使用 β -地中海贫血的 Hbb^{th3/+} 小鼠模型 (Gardenghi 2007), 显示与野生型对照相比, 在 Hbb^{th3/+} 小鼠的骨髓和脾脏中 Erfe mRNA 显著增加 (图 11)。如果人们考虑到 Hbb^{th3/+} 小鼠的骨髓已经得到扩大和它们的脾脏比野生型小鼠大 3x, 则 Erfe 的净表达甚至更大。

[0058] 多肽和组合物

[0059] 在一些实施方案中, 本发明涉及 erythroferrone 及其类似物和片段。如本文所使用, erythroferrone (包括 ERFE 和 Erfe) 以及其类似物和片段在本文中一起被称为“ERFE 多肽”。ERFE 多肽可或可不表现出 erythroferrone 活性。如本文所使用, “erythroferrone 活性”是指物质如与对照相比降低肝铁调素 mRNA 或血清铁调素水平的能力。

[0060] 如本文所使用, 术语“蛋白”、“多肽”和“肽”可互换使用以指代连接在一起的两个或多个氨基酸。氨基酸缩写的组合和长串用于表示肽。除非具体说明, 否则肽都以 N- 末端在左侧来表示, 并且序列由 N- 末端书写至 C- 末端。

[0061] 使用本领域已知方法可制备本发明的 ERFE 多肽, 所述方法包括化学合成、生物合成或者使用重组 DNA 方法的体外合成及固相合成的。参见例如, Kelly&Winkler (1990) Genetic Engineering Principles and Methods, 第 12 卷, J.K. Setlow 编辑, Plenum Press, NY, 第 1-19 页; Merrifield (1964) J Amer Chem Soc 85:2149; Houghten (1985) PNAS USA 82:5131-5135; 和 Stewart&Young (1984) Solid Phase Peptide Synthesis, 第 2 版, Pierce, Rockford, IL, 其通过引用方式并入本文中。可使用本领域已知的蛋白纯化技术纯化本发明的 ERFE 多肽, 例如反相高效液相色谱 (HPLC)、离子交换或免疫亲和色谱、过滤或尺寸排阻或者电泳。参见 Olsnes 和 Pihl (1973) Biochem. 12 (16):3121-3126; 和 Scopes (1982) Protein Purification, Springer-Verlag, NY, 其通过引用方式并入本文中。可替代地, 可通过本领域已知的重组 DNA 技术制备本发明的 ERFE 多肽。因此, 本文涵盖了编码本发明的 ERFE 多肽的多核苷酸, 并且这种多核苷酸在本文中被称为“ERFE 多核苷酸”。在一些实施方案中, 将 ERFE 多核苷酸分离。如本文所使用, “经分离的”多核苷酸是指在与多核苷酸天然存在的环境不同的环境中的多核苷酸。例如, 经分离的多核苷酸是没有如在自然中发现的正常位于多核苷酸的 5' - 和 / 或 3' 端侧翼的碱基的一种多核苷酸。

[0062] 在一些实施方案中, 本发明的 ERFE 多肽为基本上纯化的。如本文所使用, “基本上纯化的”化合物是指从它的天然环境中移除和 / 或至少约 60%、优选约 75% 和更优选约 90% 以及最优选约 95-100% 不含天然或在合成中与所述化合物缔合的其它大分子组分或化合物的化合物。

[0063] 如本文所使用, “经分离的”化合物是指由它的天然环境中分离的化合物。例如, 经分离的多肽是没有对应于全长多肽的位于 N- 末端、C- 末端或者二者的侧翼的天然氨基酸的一种多肽。例如, erythroferrone 或 ERFE 多肽的经分离的片段是指包含 erythroferrone 或 ERFE 多肽的一些、但不是所有的氨基酸残基的经分离的多肽, 但该经分离的多肽可在它

的 N- 末端、C- 末端或者两处具有非天然氨基酸,即与在 erythroferrone 或 ERFE 多肽的对应位置处氨基酸不具有同一性的不同氨基酸。在一些实施方案中,使用合成和 / 或重组技术来制备本发明的 ERFE 多肽。

[0064] 在一些实施方案中,如本文所述的一种或多种 ERFE 多肽以组合物形式提供,该组合物包含适合用于预期目的的载体。所述组合物也可包含适用于预期目的的一种或多种另外的成分。例如,为了测定,所述组合物可包含脂质体、氯硝柳胺、SL220 增溶剂 (NOF, Japan)、Cremophor EL (Sigma)、乙醇和 DMSO。为了治疗铁病症,所述组合物可包含用于肽封装 (例如壳聚糖和水凝胶)、大分子缀合、脂质化和其它化学修饰的不同的吸收促进剂和蛋白酶抑制剂、固体微粒或者纳米粒子。在一些实施方案中,本发明的组合物包含比在正常受试者中存在的浓度更高的一种或多种 ERFE 多肽。

[0065] 根据本发明的一种或多种 ERFE 多肽或其组合物可用于治疗铁代谢的疾病。如本文所使用,“铁代谢的疾病”包括以下疾病:其中异常铁代谢直接导致疾病或血液铁水平受到异常调控而导致的疾病、或铁异常调控是另一种疾病的结果或者疾病通过调控铁水平治疗等。更具体而言,根据本公开所述的铁代谢疾病包括铁超负荷疾病、缺铁病、铁生物分布紊乱、铁代谢的其它病症和可能与铁代谢相关的其它病症等。铁代谢疾病包括血色沉着病、HFE 突变血色沉着病、膜铁转运蛋白突变血色沉着病、转铁蛋白受体 2 突变血色沉着病、血幼素突变血色沉着病、铁调素突变血色沉着病、青少年血色沉着病、新生儿血色沉着病、铁调素缺乏、输血铁超负荷、地中海贫血、中间型地中海贫血、 α 地中海贫血、铁粒幼红细胞性贫血、卟啉病、迟发性皮肤卟啉症、非洲铁超负荷、高铁蛋白血症 (hyperferritinemia)、血浆铜蓝蛋白缺乏症、无转铁蛋白血症、先天性红细胞生成不良性贫血、慢性病性贫血、炎症性贫血、感染性贫血、低色小红细胞性贫血、缺铁性贫血、难治性缺铁性贫血 (iron-refractory iron deficiency anemia)、慢性肾病性贫血、促红细胞生成素障碍、缺铁性肥胖、其它贫血、过量产生铁调素或诱导其过量产生的良性或恶性的肿瘤、铁调素过剩症、弗里德共济失调、纤细综合征 (Friedreich ataxia)、哈 - 斯二氏病 (Hallervorden-Spatz disease)、威尔森氏病 (Wilson's disease)、肺含铁血黄素沉着病、肝细胞癌、癌症、肝炎、肝硬化、异食癖、慢性肾衰竭、胰岛素抵抗、糖尿病、动脉粥样硬化、神经退行性疾病、多发性硬化症、帕金森氏病 (Parkinson's disease)、亨廷顿氏病 (Huntington's disease) 和阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease)。在一些实施方案中,铁超负荷疾病是骨髓增生异常综合征。在某些情况下,“铁代谢疾病”的定义所包括的疾病和病症通常未被明确鉴定为与铁相关。例如,铁调素在鼠胰腺中高度表达表明糖尿病 (I 型或 II 型)、胰岛素抵抗、葡萄糖不耐受和其它病症可能通过治疗潜在的的铁代谢疾病来改善。参见 Ilyin, G. 等人 (2003) FEBS Lett. 542 22-26, 其通过引用方式并入本文中。因此,这些疾病都包含在广义的定义中。根据本发明使用的本领域已知的方法,本领域技术人员很容易就能确定给定的疾病是否是一种“铁代谢疾病”,所述方法包括通过引用方式并入本文中的 W02004092405 的测定,以及本领域已知的监测铁调素、血幼素或铁水平和表达的测定,例如在通过引用方式并入本文中的美国专利 No. 7, 534, 764 中描述的那些测定。在本发明的一些实施方案中,铁代谢疾病是铁超负荷疾病,它包括遗传性血色沉着病、铁负荷性贫血、酒精性肝病和慢性丙型肝炎。

[0066] 如本文所使用,与铁调素过量相关的疾病和病症包括慢性病性贫血 (也称为炎症

性贫血)、与急性或慢性感染相关的贫血、慢性肾病性贫血、由于分泌铁调素的肿瘤导致的贫血和难治性缺铁性贫血(IRIDA)。

[0067] 如本文所使用,与铁调素缺乏相关的疾病和病症包括成人和青少年形式的遗传性血色沉着病、 α -地中海贫血、 β -地中海贫血和先天性红细胞生成不良性贫血以及包括酒精性肝病及慢性乙型肝炎和慢性丙型肝炎的慢性肝病。

[0068] 如本文所使用,“+ERFE 多肽”是指表现出与小鼠和/或人 erythroferrone 相同或类似 erythroferrone 活性的 ERFE 多肽。Erythroferrone 是 +ERFE 多肽。如本文所使用,“-ERFE 多肽”是指没有表现出 erythroferrone 活性以及在一些实施方案中干扰 +ERFE 多肽活性的 ERFE 多肽。Erythroferrone 不是 -ERFE 多肽。因此,术语“ERFE 多肽”用于指代 +ERFE 多肽和 -ERFE 多肽。换言之,ERFE 多肽可以是 +ERFE 多肽或 -ERFE 多肽。

[0069] +ERFE 多肽和治疗

[0070] 在一些实施方案中,本发明涉及单独或联合 erythroferrone 的一种或多种激动剂使用一种或多种 +ERFE 多肽以治疗与铁调素过量和/或铁缺乏相关的疾病和病症(例如,炎症性贫血和难治性缺铁性贫血(IRIDA))的方法。在一些实施方案中,本发明的 +ERFE 多肽模拟 erythroferrone 的作用,即,表现出与 erythroferrone 活性的相同或基本类似的活性。在一些实施方案中,本发明涉及使用一种或多种 +ERFE 多肽以抑制、遏制或降低铁调素表达或者防止铁调素进一步表达的方法。

[0071] -ERFE 多肽和治疗

[0072] 在一些实施方案中,本发明涉及单独或联合 erythroferrone 的一种或多种拮抗剂使用一种或多种 -ERFE 多肽以治疗与铁调素缺乏和/或铁超负荷相关的疾病和病症的方法。在一些实施方案中,本发明涉及使用一种或多种 -ERFE 多肽以增加铁调素表达和/或量。在一些实施方案中,-ERFE 多肽包括与 erythroferrone 受体竞争性竞争 erythroferrone,和增加铁调素表达和/或铁调素量的那些多肽。因此,在一些实施方案中,本发明涉及单独或联合 erythroferrone 的一种或多种拮抗剂使用一种或多种 -ERFE 多肽以治疗通过铁调素缺乏导致的疾病和病症(例如, β -地中海贫血或先天性红细胞生成不良性贫血和铁中毒)的方法。

[0073] 因此,可向受试者(优选哺乳动物,例如人)施用本发明的一种或多种 ERFE 多肽。在一些实施方案中,将 ERFE 多肽以药物组合物的形式施用。在一些实施方案中,施用治疗有效量的 ERFE 多肽。如本文所使用,“治疗有效量”是如与诸如安慰剂的对照相比改善给定铁代谢疾病的症状和/或病状的量。

[0074] 通过本领域已知的标准方法可容易地确定治疗有效量。可根据疾病的临床严重性、受试者的年龄和体重或者受试者铁暴露量,由本领域普通技术人员确定待施用的剂量。对于非胃肠道制剂,本发明化合物的优选有效量范围为约 0.01 至约 10mg/kg 体重,优选约 0.1 至约 3mg/kg 体重,更优选约 0.5 至约 2mg/kg 体重。对于口服施用,优选有效量可高达约 10 倍以上。而且,使用本发明的 ERFE 多肽或组合物治疗受试者可以包括单次治疗或优选可包括一系列治疗。应当理解,实际剂量将根据特定 ERFE 多肽或组合物、具体制剂、施用模式、具体部位、宿主以及待治疗疾病有所变化。也应该理解,用于治疗的有效剂量在一特定疗程期间可能会增加或减少。本领域技术人员可使用传统剂量确定试验,根据给定的 ERFE 多肽或组合物的实验数据确定一组给定条件的最佳剂量。通过本领域已知的标准诊断测定

可得到剂量变化,并且该剂量变化会很明显。在某些情况下,可能需要慢性施用。

[0075] 本发明的药物组合物可以适合所需施用模式的单位剂量形式制备。本发明的组合物可通过任意适当的途径施用治疗,这些途径包括口服、经直肠、经鼻、局部(包括经颊和舌下)、经阴道和胃肠外(包括皮下、肌内、静脉内和皮内)。应当理解,优选途径可根据接受者状况和年龄、待治疗疾患的性质、及所选 ERFE 多肽和组成而变化。

[0076] 本发明的药物组合物包括治疗有效量的至少一种如本文所公开的 ERFE 多肽和惰性的药学上可接受的载体或稀释剂。如本文所使用,措辞“药学上可接受的载体”意在包括与药物施用相容且本领域已知的任何及所有溶剂、分散介质、衣膜、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,否则预期将其用于所述组合物中。

[0077] 组合物中还可掺入了补充性活性化合物。补充性活性化合物包括氯硝柳胺、脂质体、SL220 增溶剂(NOF, Japan)、Cremophor EL(Sigma)、乙醇和 DMSO。

[0078] 本发明的 ERFE 多肽和组合物的毒性和治疗效果可通过细胞培养物或实验动物的标准药理学程序来测定,例如测定 LD₅₀(50%群体致死剂量)和 ED₅₀(50%群体的治疗有效剂量)。毒性作用与治疗作用之间的剂量比是治疗指数,并且其可用 LD₅₀/ED₅₀的比率来表示。优选表现出大的治疗指数的 ERFE 多肽。尽管可使用表现出毒副作用的 ERFE 多肽,但应当注意设计一种可以将使此类 ERFE 多肽靶向感染组织位点的递送系统以尽量将对未感染细胞的潜在损害最小化,从而降低副作用。

[0079] 从细胞培养物测定和动物研究中获得的数据可用于制定供人使用的剂量范围。本发明的 ERFE 多肽的剂量优选在循环浓度的范围内,该范围包括几乎没有或没有毒性的 ED₅₀。剂量可能会在此范围内变化,这取决于采用的剂型和所用施用途。对于在本发明的方法中使用的任何 ERFE 多肽,治疗有效剂量可根据细胞培养物测定初步估算。可在动物模型中配制一种剂量以达到循环血浆范围,该范围包括如在细胞培养物中测得的 IC₅₀(即测试化合物达到症状最大抑制一半的浓度)。这些信息可以用于更准确地确定有效剂量。血浆水平可例如通过高效液相色谱进行测量。

[0080] 本发明也提供包括与试剂、装置、指导材料或者其组合一起包装的本发明的一种或多种 ERFE 多肽和/或组合物的试剂盒。例如,试剂盒可包括用于进行测定的试剂;用于诊断、治疗或监测铁代谢病症的药物和组合物;用于获得待测定的样品的装置;用于混合试剂和进行测定的装置等。

[0081] 以下实施例旨在说明而非限制本发明。

[0082] 实验

[0083] 1. Erythroferrone 在铁代谢的红细胞类依赖性调控中的作用

[0084] Erythroferrone 产生 - 初始数据表明在出血和 EPO 注射之后在骨髓和脾脏中 Erfe mRNA 均显著增加。如下鉴定在正常条件下和在应激红细胞生成期间表达 Erfe 转录物的骨髓和脾细胞类型:简而言之,所有的脾和骨髓细胞均从对照小鼠和静脉抽血的小鼠(15 小时)中分离,并通过流式细胞术基于 Ter119、CD71 的水平和前向散射来分类。参见例如, Socolovsky 2007; Chen 2009。Erfe mRNA 表达通过在各细胞群体中相对于两个管家基因进行 qPCR 来定量。与对照小鼠相比,在静脉抽血之后在所有成红细胞阶段中 Erfe 表达大幅增加(图 6)(ProE, EryA、B 和 C)。因为 EryB 阶段相对丰富,所以这些细胞可能构成

骨髓中 erythroferrone 的主要来源。为了确定 Erfe 是否确实为红细胞类特异性产物,可进行在基线处和在静脉抽血之后代表性小鼠组织的 qPCR 分析。

[0085] 造血细胞 - 为了检查造血细胞对生物活性 erythroferrone 产生的贡献,可使用自体移植物作为对照在骨髓抑制辐照之后在 Erfe^{-/-}和 Erfe^{+/+}小鼠之间进行交互骨髓移植。此类实验可根据最新兽医指南来进行。参见 Duran-Struuck 2009。在进行 3 周红细胞生成恢复和对辐照和移植物的炎症反应终止之后,在 500 μ l 静脉抽血之后 15 小时对铁调素的抑制可用作表型读出。可通过完整对比破坏的 Erfe 等位基因的骨髓 DNA 的 qPCR 证实植入和供体细胞优势,并且可通过 qRT-PCR(或 ELISA 等)评估 Erfe 的产生。预计所述表型将通过骨髓转移。在不太可能的替代性结果中,可测定作为 erythroferrone 来源的其它细胞类型。

[0086] 通过 EPO 调控 - EPO 对 erythroferrone 表达可具有双重作用:1) 它经由增加通过原成红细胞 - 嗜碱性成红细胞阶段的前体的成活率来增加表达 erythroferrone 的细胞(中幼红细胞)的数目;或者 2) 它可直接或间接调控 erythroferrone mRNA 浓度。因为在小鼠中 EPO 注射之后 4 小时 Erfe 增加接近最大 30 倍(图 4),而此时脾或骨髓祖红细胞的数目仅稍微增加,所以第二机制占优势,并且对 EPO 的响应可能为成红细胞自发的。然而,可通过以下方法测定通过 EPO 的调控:简而言之,将刚收集的小鼠骨髓细胞孵育 4 小时,同时使用 0-2.5u/ml 浓度的 EPO 补充培养基,然后使用本领域的已知方法来分类类红细胞。通过为 EPO 剂量函数的 Erfe 表达的 qRT-PCR 来分析各红细胞类成熟阶段。

[0087] 因为基础红细胞生成不需要 erythroferrone,所以预计通过 EPO 受体 (EPOR) 应激途径来调控 erythroferrone。Stat5 是用于激活应激红细胞生成的基因的 EPO-EPOR/Jak2 途径的主要转录因子 (Teglund1998;Menon 2006),并且使用 Genomatix 软件对小鼠和人 erythroferrone 启动子的三千碱基分析显示多个可能的 Stat5(或其它 Stat) 结合元件和 GATA 结合基序。因此,人们可检查根据以下方法 Erfe 转录是否通过 Stat 途径来调控:培养来自小鼠胎肝和小鼠骨髓的红细胞类前体 (England 2011),使用具有或没有 Stat5 抑制剂(匹莫齐特或者 N' -((4-氧代-4H-色烯-3-基)亚甲基)烟酸酰胺)的梯度浓度的 EPO 处理 4 小时,并通过 qPCR 评估对 Erfe mRNA 水平的影响。如果成红细胞对 Stat5 抑制剂短暂暴露耐受较差,则人们可使用在 EPO 处理下进行红细胞类分化的 UT7 细胞系或连续 CD36E 细胞系,一种具有产生血红蛋白能力的祖红细胞细胞系 (Wong 2010),或 J2E 细胞系 (Greene 2002)。使用这些细胞系和 Erfe 启动子萤光素酶构建体,进行推定 Stat5 结合位点的定点诱变以测试 EPO 调控 Erfe 启动子的机制。最后,如果这些方法无法成功测定 STAT5 途径是否调控 Erfe 表达,则人们可得到缺乏梯度 STAT5 响应的小鼠 EPOR-HM 小鼠,并且确定这些小鼠是否调控响应 EPO 的 Erfe。参见 Porpiglia 2012。尽管不太可能,在调控 Erfe 中 EPO 受体信号传导的一种或多种可选择途径可能比 STAT5 更加重要。通常,对这些途径的认识非常少,但是这些途径包括 PI3-激酶和 MAP-激酶途径,并且主要参与调控成红细胞存活率和增殖。参见 Richmond 2005;Bouscary 2003。

[0088] EPO 剂量依赖性 - EPO 的治疗剂量降低铁调素浓度,甚至在正常或增加的内源性 EPO 产生的条件下,以及甚至面临炎症和铁超负荷下。参见 Huang 2009。EPO 的这种重要作用未得到理解,但 EPO 是重要的,因为它可有助于其中铁调素增高和铁在巨噬细胞中被整合的炎症性贫血和癌性贫血的治疗效果。可测定与 WT 对照相比在 ErfeKO 和杂合体动物中

肝脏铁调素 mRNA 和血清铁调素对 EPO 的梯度剂量（单次注射，0.2–200U）的响应的剂量依赖性。如在 WT 小鼠中初始数据所显示，EPO 注射具有如单次静脉抽血对铁调素或 Erfe mRNA 表达时程的影响相同的影响，因此预期经 EPO 注射的 Erfe^{-/-}小鼠将不能类似于静脉抽血的 Erfe^{-/-}来抑制铁调素。在较高 EPO 浓度下在 Erfe^{-/-}KO 小鼠中抑制铁调素的可替换途径可能变得清楚。尽管报道了 EPO 对铁调素表达的直接影响 (Pinto 2008)，但本发明人未在实验中观察到这些抑制。如果高剂量 EPO 在 Erfe^{-/-}小鼠中抑制铁调素，则人们可或许通过作用于也可在某些原代肝细胞培养物中混合的非肝细胞的细胞群体，再检查高浓度的 EPO 是否可间接抑制在肝脏中铁调素 mRNA。

[0089] 源于溶血的贫血 - 苯胍诱导的溶血模型通常用于小鼠应激红细胞生成的研究，并且该贫血与铁调素抑制相关 (Nicolas 2002)。该模型不同于出血性贫血，因为其恢复取决于血红素和铁循环。可分析在单剂量的苯胍 100mg/kg (Lim 1998) 之后 Erfe 去除对从急性溶血性贫血恢复的影响。在第 2、4 和 6 天分析小鼠的全血细胞计数、红细胞类成熟（通过流式细胞术），铁调素表达和铁参数。预计在 Erfe^{-/-}小鼠中铁调素不会受到抑制，并且它们将具有延迟的红细胞类恢复。

[0090] 补偿性饮食铁吸收和由储备中释放铁 - 在人类中，饮食铁吸收占总每日铁需求的 10% 以下，并且大部分铁来源于循环衰老红细胞的巨噬细胞。然而，在标准饲料喂食的小鼠中，饮食吸收提供接近 50% 的总每日铁需求。参见 Ramos 2011。因此，为了区分 Erfe 去除是否在由出血循环期间饮食利用对比循环的铁具有不同作用，可对小鼠铁储备和饮食铁含量进行操作。为了评估 Erfe 缺乏对饮食铁吸收的影响，人们首先通过喂食动物 4ppm 饮食两周来耗尽铁储备。一旦通过在一亚群的小鼠中肝铁和脾铁基线分析证实铁储备量较低，则将另一组动物静脉抽血 500 μ l 并且饲喂充满铁的 (300ppm) 饮食。为了评估 Erfe 对铁循环和由储备中动员的影响，使用右旋糖酐铁来预处理小鼠以向它们提供充足的铁储备，从而补偿 500 μ l 失血 (300 μ g 的铁)，并且一周之后进行静脉抽血和饲喂 4ppm 缺铁饮食。预计在 Erfe KO 小鼠中缺乏铁调素抑制将会损坏储备铁释放和由饮食吸收铁的代偿性增加。其它结果会导致如由其它人 (Chaston 2008) 所报道的小肠对比巨噬细胞铁运输差别调控或者它们调控冗余途径的可能性。

[0091] 其它可能的活性：Erfe 可能对骨髓环境产生某些影响。为了检测主要影响，人们可比较在过表达 Erfe 的 Erfe^{-/-}和 WT 小鼠中股骨段的形态。为了比较在这些小鼠中的红细胞谱系，人们可通过基于 c-kit、Ter119、CD71 和 / 或 CD44 的表达水平的流式细胞术来分析总脾细胞和骨髓细胞。参见 Socolovsky 2007 ;Chen 2009。

[0092] 2. Erythroferrone 表征、其活性和作用机制

[0093] 可表征 erythroferrone 的质量和组成（包括它的细胞内和细胞外同工型），并且进行结构域删除分析以建立其功能组件。也可确定 erythroferrone 是否分泌至循环内和它是否直对肝脏产生影响。Erythroferrone 的重组型和 / 或合成型可用于检查它对铁调素体内和体外表达的影响。可检查 erythroferrone 以及 erythroferrone 的受体对红细胞类前体及其红细胞类分化的影响。

[0094] 物理化学和组成特征 - 人们可使用编码融合到 C-末端 FLAG 和 6-组氨酸标记的小鼠和人 erythroferrone cDNA 序列的质粒来进行 HEK293T 细胞 (Freestyle 293 表达系统, Invitrogen) 中等规模的瞬时转染。在哺乳动物细胞中表达增加以下可能性：重组蛋

白越来越接近实际上可行的天然形式。可纯化和测定来自细胞裂解物的胞内形式和来自培养基中分泌形式。根据之前的实验,优选 2 步纯化用于获得令人满意的纯蛋白,该纯蛋白可用于体内和体外处理。因此,主要可使用对 C- 末端标记之一特异的亲和珠进行重组 erythroferrone 的初始纯化,并可通过 HPLC 进行最后的纯化。为了防止在纯化期间活性被潜在抑制或者被标记抑制,人们也可测试经部分纯化的级分和经处理去除标记的蛋白的活性。可使用凝胶渗透色谱和 SDS-PAGE 表征纯化蛋白的大小,然后可通过 N- 末端 Edman 降解和通过蛋白酶切割和碎裂质谱来测定序列。使用具有针对 erythroferrone 的抗体的蛋白质印迹,人们可比较重组蛋白与在培养物中通过经 EPO 刺激的鼠成红细胞分泌的 Erfe 的大小。

[0095] ERFE 多肽和活性 - 人们可通过两种互补的方法分析 ERFE 多肽的功能形式和结构域。首先,通过将部分或完全纯化的可溶性和细胞来源的 ERFE 注射至小鼠内来测定它们的生物活性。在第二方法中,慢病毒递送方法用于研究 Erfe 变体,其中修饰所述蛋白以去除其单独结构域部分或者全部。最初,人们可取代遗传信号序列和使所述蛋白进行 N- 末端截短分析以去除 N- 末端结构域 (NTD1) 和 / 或胶原结构域 (图 12),从而测定这些对 Erfe 体内活性是否重要。N- 末端结构域 2 (NTD2) 可能更难完全去除,因为它的 Cys142 可能参与二硫键配对,但是可去除它的至少一半 N- 末端。根据它与其它细胞因子的同源性,预期 TNF- 样 C- 末端是活性部分,并且其它结构域促进合成、分泌或可能的替代性功能,例如膜缔合形式的 Erfe 的细胞间信号传导。在两种方法中,4-15 小时之后的读出将包括通过免疫测定和 qPCR 测量在肝脏中铁调素 mRNA 表达的血清铁调素。为了防止当饲喂小鼠导致中等铁超负荷的“标准”饮食 (通常 270-300ppm) 时刺激铁调素的强铁信号的干扰,可在注射之前饲喂小鼠低 (4ppm Fe) 或充足 (50ppm Fe) 铁饮食中 2 周。这种预处理确保铁调素对正刺激和负刺激的响应。

[0096] 红细胞类成熟 - Erythroferrone 也可对红细胞类扩增和成熟产生作用,无论是直接还是通过它对铁递送的作用产生。显示在缺铁性贫血之后补充铁会增加有核类红细胞 (erythroid cells) 2.5 倍,而增加成红细胞多达 3.9 倍,这表明铁的利用率限制看成红细胞扩增。在初步研究中,将流式细胞术 (Ter119、CD71、CD44 标记) (Socolovsky 2007 ;Chen 2009) 用于分析与未经处理的同窝小鼠对照相比在静脉抽血的野生型、杂合体和 KO 小鼠的骨髓和脾脏中成红细胞的成熟。在静脉抽血后 72 小时,在 Erfe^{-/-}小鼠中类红细胞看起来比 WT 和杂合体中类红细胞更加不成熟,但未观察到更多死细胞,从而表明 Erfe 在成红细胞针对细胞凋亡的保护中无作用。因为 KO 小鼠看起来具有相对较少的不成熟前体 (早期成红细胞) 以及在 Erfe KO 小鼠中细胞凋亡似乎未改变,所以 Erfe 可能在早期祖细胞增殖和分化的调控中起到作用。

[0097] 人们通过比较 Erfe KO 小鼠与 WT 小鼠,可通过在红细胞生成激发之后各时间间隔下收集的脾和骨髓祖细胞以及培养的胎肝脏祖细胞的流式细胞术,研究在 erythroferrone 红细胞生成中的作用。人们还可使用在 Erfe KO 和 WT 小鼠中类似的方法研究注射的 erythroferrone 对红细胞生成的影响。可通过 Ter119、CD71 和 / 或 CD44 表达表征成红细胞分化。可通过使用 AnnexinV 和 7- 氨基 - 放线菌素 D (7-AAD) 分别染色来分析细胞凋亡信号传导和细胞死亡。

[0098] 体内 Erfe 处理及随后对成熟阶段之间的红细胞前体数目和分布的流式细胞分析

将证实 Erfe 对红细胞前体增殖或成熟的任何显著作用。然而,它们无法确定所述作用是由铁和铁调素来介导还是通过 Erfe 直接影响红细胞前体来介导。为了回答这个问题,人们可研究添加到胎肝脏红细胞前体培养物中的 Erfe 的作用,其中铁(含铁转铁蛋白)存在于培养基中并且铁调素浓度非常低。在添加的重组 Erfe 存在或缺失的情况下,可进行来自 WT 和 Erfe^{-/-}小鼠的 14.5-15.5 天胎肝脏红细胞前体的体外培养。如前所述通过流式细胞术可分析红细胞前体的成熟。在所有这些研究中,人们可比较在 Erfe KO 和 WT 小鼠之间和 Erfe 处理和假处理条件之间的前体类群或细胞死亡/细胞凋亡指数。

[0099] ERFE 的受体 - 基于 erythroferrone 与 TNF α 的类似性,erythroferrone 受体可属于 TNF 受体 (TNFR) 家族。在该家族中多个受体均是孤儿,即,缺乏任何已知的配体。参见 Bossen 2006。因此,人们可通过流式细胞术来筛选已知鼠和人 TNFR 家族的表达文库。受体构建体可在 HEK293 细胞中瞬间表达 (Bossen 2006),并且可使用鼠或人的 FLAG- 标记形式的 erythroferrone (图 10G)、随后为生物素化的抗-FLAG M2 抗体和 PE- 偶联的链霉亲和素来对这些受体构建体染色。如果没有已知的 TNFR 家族结合 erythroferrone,则人们可使用在 384 孔板中粘附细胞和高通量荧光显微术来对来自小鼠和人 cDNA 表达文库的所有受体样分子进行机器高通量筛选。可对命中进行流式细胞确认。可通过检查组织表达数据库(例如,Nextbio Body Atlas)来筛选所有鉴定的受体的表达方式,从而证实所述受体在 erythroferrone 的靶组织(如果介体直接作用则为肝细胞)中表达,以及识别针对 erythroferrone 的潜在的另外的组合和器官靶。人们也可进行生化方法来鉴定与 erythroferrone 相互作用的蛋白。可将 Erythroferrone 和/或 ERFE 多肽固定在磁珠上,并且将它们用于从小鼠原代肝细胞(在之前研究中被鉴定为 ERFE 靶的其它细胞类型)的膜或细胞裂解物中提取任何结合蛋白。可使用 HPLC- 质谱鉴定该复合物。一旦鉴定出 erythroferrone 受体,则人们可使用它与其它受体(如何有)的类似性来明确它潜在的信号传导机制。

[0100] 3. 在与铁调素抑制相关的铁超负荷病症中 erythroferrone 是否增加

[0101] 可测定在健康志愿者和患者血清样品以及小鼠模型中 Erythroferrone 浓度以证实 erythroferrone 在具有无效红细胞生成的贫血症中作为病理铁调素抑制剂。

[0102] 正常和病理 erythroferrone 浓度 - 针对 erythroferrone 和/或 ERFE 多肽的抗-erythroferrone 抗体可用于测定在受试者中正常和异常 erythroferrone 浓度。发现在蛋白质印迹中针对 Erfe 蛋白的两种不同表位的抗小鼠 Erfe 抗体与重组蛋白强烈反应(图 9C)。ELISA 测定可用于测量受试者中 ERFE 的循环水平,该受试者包括正常受试者和在静脉抽血、溶血性贫血之后的受试者或者在贫血恢复期的受试者以及患有铁病症的受试者,该铁病症包括缺铁性贫血和各种形式的地中海贫血(包括中间型地中海贫血)。

[0103] Erythroferrone 的去除 - 在中间型地中海贫血的患者中缺乏铁调素 (Papanikolaou 2005;Origa 2007),因此这解释了为什么甚至在没有红细胞输液或者任何其它非饮食铁来源下这些患者超吸收饮食铁并发展成铁超负荷。为了探究 erythroferrone 作为在 β -地中海贫血中致病性铁调素抑制剂的作用,人们可分析在中间型地中海贫血的小鼠模型(例如 Hbb^{th3/+})中 Erfe 去除对铁调素表达和肝脏铁超负荷的影响。Hbb^{th3/+}小鼠是 β -中间型地中海贫血的两种可获得模型中更为严重的一种,它具有 7-9g/dL 的 Hb 水平,循环 EPO 浓度增加 5 至 10 倍,并且红细胞生成无效(包括髓外部位)。它表现出较低的

铁调素,但当铁超负荷增加到6月龄的菌株对照的铁超负荷的3至5倍时,铁调素最终会上升到“正常”水平。参见 Gardenghi 2007 ;Nai 2012。

[0104] 例如,测量6月龄的 $Hbb^{th3/+}$ 小鼠和其 WT 菌株对照中的 Erfe 水平,从而确定高水平的 Erfe 是否为不恰当低水平铁调素的原因。与 WT 小鼠相比,在 $Hbb^{th3/+}$ 小鼠的骨髓和脾脏中 Erfe mRNA 显著增加(图 11)。为了测试增加的 Erfe 是否为在该模型中观察到的铁超负荷的原因,人们可确定去除 Erfe 表达的作用。Erfe 基因在小鼠染色体 1 上,而 β -球蛋白基因在小鼠染色体 7 上,因此人们可通过如在中间型地中海贫血小鼠中其它基因所进行的那样繁殖来生成 $Hbb^{th3/+}Erfe^{-/-}$ 小鼠。参见 Nai 2012 ;Gardenghi 2010。在 C57B/6J 背景下的 $Hbb^{th3/+}$ 小鼠可从 Jackson Labs (B6.129P2- $Hbb-b1tm1Unc$ $Hbb-b2tm1Unc$ /J, 保存编号,002683) 获得。

[0105] 以下参考文件通过引用方式整体并入本文中:

[0106] Ashby, D. R., et al. (2010). Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica* 95, 505-508.

[0107] Bossen, C., et al. (2006). Interactions of Tumor Necrosis Factor (TNF) and TNF Receptor Family Members in the Mouse and Human. *J. Biol. Chem.* 281, 13964-13971.

[0108] Bouscary, D., et al. (2003). Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood* 101, 3436-3443.

[0109] Bramey, T., et al. (2009). No evidence for protective erythropoietin alpha signalling in rat hepatocytes. *BMC Gastroenterology* 9, 26.

[0110] Casanovas, et al. (2013) The murine growth differentiation factor 15 is not essential for systemic iron homeostasis in phlebotomized mice. *Haematologica*. 98(3):444-447.

[0111] Centis, F., et al. (2000). The importance of erythroid expansion in determining the extent of apoptosis in erythroid precursors in patients with β -thalassemia major. *Blood* 96, 3624-3629.

[0112] Chaston, T., et al. (2008). Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells. *Gut* 57, 374-382.

[0113] Chen, K., et al. (2009). Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *PNAS USA* 106, 17413-17418.

[0114] Clark, R. J., et al. (2011). Understanding the structure/activity relationships of the iron regulatory peptide hepcidin. *Chem. Biol* 18, 336-343.

[0115] Duran-Struuck and Dysko (2009). Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies. *J Am. Assoc. Lab. Anim Sci* 48, 11-22.

[0116] England, S. J., et al. (2011). Immature erythroblasts with extensive ex vivo self-renewal capacity emerge from the early mammalian fetus. *Blood* 117,

2708-2717.

[0117] Fernandes, A., et al. (2009). The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. *Blood* 114, 437-443.

[0118] Finch, C. (1994). Regulators of iron balance in humans. *Blood* 84, 1697-1702.

[0119] Ganz and Nemeth (2011). Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu. Rev. Med.* 62, 347-360.

[0120] Ganz and Nemeth (2012). Iron metabolism: interactions with normal and disordered erythropoiesis. *Cold Spring. Harb. Perspect. Med.* 2, a011668.

[0121] Ganz, T., et al. Mini-Hepcidin Peptides and Methods of Using thereof. Patent Application. US 2012/0040894 A1. 6-10-2010.

[0122] Ganz, T., et al. (2008). Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood* 112, 4292-4297.

[0123] Gardenghi, S., et al. (2010). Hepcidin as a therapeutic tool to limit iron overload and improve anemia in beta-thalassemic mice. *J Clin. Invest* 120, 4466-4477.

[0124] Gardenghi, S., et al. (2007). Ineffective erythropoiesis in β -thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. *Blood* 109, 5027-5035.

[0125] Ghoti, H., et al. (2011). Increased serum hepcidin levels during treatment with deferasirox in iron-overloaded patients with myelodysplastic syndrome. *Br. J Haematol.* 153, 118-120.

[0126] Goodnough, J. B., et al. (2012). Inhibition of hepcidin transcription by growth factors. *Hepatology* 56, 291-299.

[0127] Greene, W. K., et al. (2002). Enforced expression of HOX11 is associated with an immature phenotype in J2E erythroid cells. *Br. J. Haematol* 118, 909-917.

[0128] Horiuchi, T., et al. (2010). Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 49, 1215-1228.

[0129] Hrinda and Goldwasser (1969). On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. VI. Induced accumulation of iron by marrow cells. *Biochim. Biophys. Acta* 195, 165-175.

[0130] Huang, H., et al. (2009). Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli. *Blood*. 113(15):3593-3599.

[0131] Karur, V. G., et al. (2006). Lyn kinase promotes erythroblast expansion and late-stage development. *Blood* 108, 1524-1532.

[0132] Kattamis, A., et al. (2006). The effects of erythropoietic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major. *Haematologica* 91, 809-812.

[0133] Kimura, H., et al. (1986). Hematopoiesis in the rat: Quantitation of

hematopoietic progenitors and the response to iron deficiency anemia. *J. Cell. Physiol.* 126, 298–306.

[0134] Lim, S. K., et al. (1998). Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis. *Blood* 92, 1870–1877.

[0135] Liu, Y., et al. (2006). Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood* 108, 123–133.

[0136] Maes, K., et al. (2010). In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenetic protein 2. *Blood* 116, 3635–3644.

[0137] Mastrogriannaki, M., et al. (2011). Hepatic HIF-2 down-regulates hepcidin expression in mice through epo-mediated increase in erythropoiesis. *Haematologica*.

[0138] Menon, M. P., et al. (2006). Signals for stress erythropoiesis are integrated via an erythropoietin receptor-phosphotyrosine-343-Stat5 axis. *J Clin Invest* 116, 683–694.

[0139] Merryweather-Clarke, A. T., et al. (2011). Global gene expression analysis of human erythroid progenitors. *Blood* 117, e96–e 108.

[0140] Nai, A., et al. (2012). Deletion of TMPRSS6 attenuates the phenotype in a mouse model of beta-thalassemia. *Blood* 119, 5021–5029.

[0141] Nemeth, E., et al. (2006). The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood* 107, 328–333.

[0142] Nemeth, E., et al. (2004a). IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin. Invest* 113, 1271–1276.

[0143] Nemeth, E., et al. (2005). Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood* 105, 1803–1806.

[0144] Nemeth, E., et al. (2004b). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306, 2090–2093.

[0145] Nemeth, E., et al. (2003). Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 101, 2461–2463.

[0146] Nicolas, G., et al. (2002). The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin. Invest* 110, 1037–1044.

[0147] Origa, R., et al. (2007). Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia. *Haematologica* 92, 583–588.

[0148] Pak, M., et al. (2006). Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 108, 3730–3735.

[0149] Papanikolaou, G., et al. (2005). Hepcidin in iron overload disorders. *Blood* 105, 4103–4105.

- [0150] Park, C. H., et al. (2001).Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* 276,7806-7810.
- [0151] Pinto, J. P., et al. (2008).Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBPalpha. *Blood* 111, 5727-5733.
- [0152] Pippard, M. J., et al. (1979).IRON ABSORPTION AND LOADING IN[beta]-THALASSEMIA INTERMEDIA. *The Lancet* 314,819-821.
- [0153] Porpiglia, E., et al. (2012).Stat5 Signaling Specifies Basal versus Stress Erythropoietic Responses through Distinct Binary and Graded Dynamic Modalities. *PLoS Biol* 10,e1001383.
- [0154] Preza, G. C., et al. (2011).Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. *J Clin. Invest* 121,4880-4888.
- [0155] Qiao, B., et al. (2012).Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab* 15,918-924.
- [0156] Ramos, E., et al. (2011).Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology* 53,1333-1341.
- [0157] Ramos, E., et al. (2012).Minihepcidins prevent iron overload in a hepcidin-deficient mouse model of severe hemochromatosis. *Blood*. 120(18) : 3829-3836.
- [0158] Ramos, P., et al. (2010).Iron metabolism and ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia mouse models. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1202,24-30.
- [0159] Ravasi, G., et al. (2012).Hepcidin expression in iron overload diseases is variably modulated by circulating factors. *PLoS. ONE.* 7, e36425.
- [0160] Richmond, Terri D., et al. Tuning cells red:signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends in Cell Biology* 15[3],146-155. 3-1-2005.
- [0161] Rivera, S., et al. (2005a).Hepcidin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia. *Blood* 105,1797-1802.
- [0162] Rivera, S., et al. (2005b).Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood* 106, 2196-2199.
- [0163] Sadahira, Y., et al. (2000).Impaired splenic erythropoiesis in phlebotomized mice injected with CL2MDP-liposome:an experimental model for studying the role of stromal macrophages in erythropoiesis. *J Leukoc Biol* 68, 464-470.
- [0164] Seldin, M. M., et al. (2012).Myonectin(CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis. *J. Biol. Chem.* 287,11968-11980.
- [0165] Sham, R. L., et al. (2009).Hereditary hemochromatosis due to resistance to hepcidin:high hepcidin concentrations in a family with C326S ferroportin

mutation. Blood 114, 493–494.

[0166] Socolovsky, M. (2007). Molecular insights into stress erythropoiesis. Curr. Opin. Hematol. 14, 215–224.

[0167] Tanno, T., et al. (2007). High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. Nat. Med. 13, 1096–1101.

[0168] Tanno, T., et al. (2010a). Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. Curr. Opin. Hematol. 17, 184–190.

[0169] Tanno, T., et al. (2009). Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. Blood 114, 181–186.

[0170] Tanno, T., et al. (2010b). Expression of growth differentiation factor 15 is not elevated in individuals with iron deficiency secondary to volunteer blood donation. Transfusion 50, 1532–1535.

[0171] Teglund, S., et al. (1998). Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. Cell 93, 841–850.

[0172] Vokurka, M., et al. (2006). Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. Physiol Res. 55, 667–674.

[0173] Wong, S., et al. (2010). Establishment of an erythroid cell line from primary CD36⁺erythroid progenitor cells. Exp. Hematol. 38, 994–1005.

[0174] Zhang, J., et al. (2003). Role of Ras signaling in erythroid differentiation of mouse fetal liver cells: functional analysis by a flow cytometry-based novel culture system. Blood 102, 3938–3946.

[0175] 为了达到理解或完成本发明公开的程度, 本文提及的所有出版物、专利和专利申请以与其各自单独地并入同等的程度通过引用方式明确并入其中。

[0176] 尽管已经描述了本发明的示例性实施方案, 但是本领域技术人员应当注意, 在本公开内容范围内均为示例性, 而且各种其它替代、调整 and 修改均在本发明范围内可进行。因此, 本发明不受如本文所示的具体实施方案的限制, 而仅受以下权利要求的限制。

[0001]

序列表

<110> 加利福尼亚大学董事会

<120> Erythroferrone 和 ERFE 多肽以及调节铁代谢的方法

<130> 034044.119W01

<150> 61/721,322

<151> 2012-11-01

<160> 18

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 354

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Ala Pro Ala Arg Arg Pro Ala Gly Ala Arg Leu Leu Leu Val Tyr
1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Ala Ala Ala Ala Ala Gly Leu Gly Ser Pro Glu Pro
20 25 30

Gly Ala Pro Ser Arg Ser Arg Ala Arg Arg Glu Pro Pro Pro Gly Asn
35 40 45

Glu Leu Pro Arg Gly Pro Gly Glu Ser Arg Ala Gly Pro Ala Ala Arg
50 55 60

Pro Pro Glu Pro Thr Ala Glu Arg Ala His Ser Val Asp Pro Arg Asp
65 70 75 80

Ala Trp Met Leu Phe Val Arg Gln Ser Asp Lys Gly Val Asn Gly Lys
85 90 95

Lys Arg Ser Arg Gly Lys Ala Lys Lys Leu Lys Phe Gly Leu Pro Gly
100 105 110

Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ile Ile Pro
115 120 125

Pro Glu Ala Leu Leu Lys Glu Phe Gln Leu Leu Leu Lys Gly Ala Val
130 135 140

Arg Gln Arg Glu Arg Ala Glu Pro Glu Pro Cys Thr Cys Gly Pro Ala
145 150 155 160

Gly Pro Val Ala Ala Ser Leu Ala Pro Val Ser Ala Thr Ala Gly Glu
165 170 175

Asp Asp Asp Asp Val Val Gly Asp Val Leu Ala Leu Leu Ala Ala Pro
180 185 190

Leu Ala Pro Gly Pro Arg Ala Pro Arg Val Glu Ala Ala Phe Leu Cys
195 200 205

[0002]

Arg Leu Arg Arg Asp Ala Leu Val Glu Arg Arg Ala Leu His Glu Leu
 210 215 220
 Gly Val Tyr Tyr Leu Pro Asp Ala Glu Gly Ala Phe Arg Arg Gly Pro
 225 230 235 240
 Gly Leu Asn Leu Thr Ser Gly Gln Tyr Arg Ala Pro Val Ala Gly Phe
 245 250 255
 Tyr Ala Leu Ala Ala Thr Leu His Val Ala Leu Gly Glu Pro Pro Arg
 260 265 270
 Arg Gly Pro Pro Arg Pro Arg Asp His Leu Arg Leu Leu Ile Cys Ile
 275 280 285
 Gln Ser Arg Cys Gln Arg Asn Ala Ser Leu Glu Ala Ile Met Gly Leu
 290 295 300
 Glu Ser Ser Ser Glu Leu Phe Thr Ile Ser Val Asn Gly Val Leu Tyr
 305 310 315 320
 Leu Gln Met Gly Gln Trp Thr Ser Val Phe Leu Asp Asn Ala Ser Gly
 325 330 335
 Cys Ser Leu Thr Val Arg Ser Gly Ser His Phe Ser Ala Val Leu Leu
 340 345 350
 Gly Val
 <210> 2
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 2
 Met Ala Ser Thr Arg Arg Pro Val Gly Ala Arg Thr Leu Leu Ala Cys
 1 5 10 15
 Ala Ser Leu Leu Ala Ala Met Gly Leu Gly Val Pro Glu Ser Ala Glu
 20 25 30
 Pro Val Gly Thr His Ala Arg Pro Gln Pro Pro Gly Ala Glu Leu Pro
 35 40 45
 Ala Pro Pro Ala Asn Ser Pro Pro Glu Pro Thr Ile Ala His Ala His
 50 55 60
 Ser Val Asp Pro Arg Asp Ala Trp Met Leu Phe Val Lys Gln Ser Asp
 65 70 75 80
 Lys Gly Ile Asn Ser Lys Arg Arg Ser Lys Ala Arg Arg Leu Lys Leu
 85 90 95
 Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly
 100 105 110
 Pro Phe Ile Pro Ser Glu Val Leu Leu Lys Glu Phe Gln Leu Leu Leu

[0003]

115	120	125
Lys Gly Ala Val Arg Gln Arg Glu Ser His Leu Glu His Cys Thr Arg 130 135 140		
Asp Leu Thr Thr Pro Ala Ser Gly Ser Pro Ser Arg Val Pro Ala Ala 145 150 155 160		
Gln Glu Leu Asp Ser Gln Asp Pro Gly Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala 165 170 175		
Ala Thr Leu Ala Gln Gly Pro Arg Ala Pro Arg Val Glu Ala Ala Phe 180 185 190		
His Cys Arg Leu Arg Arg Asp Val Gln Val Asp Arg Arg Ala Leu His 195 200 205		
Glu Leu Gly Ile Tyr Tyr Leu Pro Glu Val Glu Gly Ala Phe His Arg 210 215 220		
Gly Pro Gly Leu Asn Leu Thr Ser Gly Gln Tyr Thr Ala Pro Val Ala 225 230 235 240		
Gly Phe Tyr Ala Leu Ala Ala Thr Leu His Val Ala Leu Thr Glu Gln 245 250 255		
Pro Arg Lys Gly Pro Thr Arg Pro Arg Asp Arg Leu Arg Leu Leu Ile 260 265 270		
Cys Ile Gln Ser Leu Cys Gln His Asn Ala Ser Leu Glu Thr Val Met 275 280 285		
Gly Leu Glu Asn Ser Ser Glu Leu Phe Thr Ile Ser Val Asn Gly Val 290 295 300		
Leu Tyr Leu Gln Ala Gly His Tyr Thr Ser Val Phe Leu Asp Asn Ala 305 310 315 320		
Ser Gly Ser Ser Leu Thr Val Arg Ser Gly Ser His Phe Ser Ala Ile 325 330 335		
Leu Leu Gly Leu 340		
<210> 3		
<211> 17		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 基于智人和小家鼠序列的合成肽		
<400> 3		
Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly 1 5 10 15		
Pro		

[0004]

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基于智人和小家鼠序列的合成肽

<400> 4

Ala His Ser Val Asp Pro Arg Asp Ala Trp Met Leu Phe Val
1 5 10

<210> 5
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基于智人和小家鼠序列的合成肽

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> Xaa 可为任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa 可为任何天然存在的氨基酸

<400> 5

Ala His Ser Val Asp Pro Arg Asp Ala Trp Met Leu Phe Val Xaa Gln
1 5 10 15

Ser Asp Lys Gly Xaa Asn
20

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基于智人和小家鼠序列的合成肽

<400> 6

Leu Leu Lys Glu Phe Gln Leu Leu Leu Lys Gly Ala Val Arg Gln Arg
1 5 10 15

Glu

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基于智人和小家鼠序列的合成肽

<400> 7

Gly Pro Arg Ala Pro Arg Val Glu Ala Ala Phe
1 5 10

<210> 8
<211> 16

[0005]

<212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 基于智人和小鼠序列的合成肽

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa 可为任何天然存在的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa 可为任何天然存在的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa 可为任何天然存在的氨基酸

 <400> 8
 Val Xaa Arg Arg Ala Leu His Glu Leu Gly Xaa Tyr Tyr Leu Pro Xaa
 1 5 10 15

 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 基于智人和小鼠序列的合成肽

 <400> 9
 Gly Leu Asn Leu Thr Ser Gly Gln Tyr
 1 5

 <210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 基于智人和小鼠序列的合成肽

 <400> 10
 Ala Pro Val Ala Gly Phe Tyr Ala Leu Ala Ala Thr Leu His Val Ala
 1 5 10 15

 Leu

 <210> 11
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 基于智人和小鼠序列的合成肽

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 可为任何天然存在的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)

[0006]

<223> Xaa 可为任何天然存在的氨基酸

<400> 11

Xaa Met Gly Leu Glu Xaa Ser Ser Glu Leu Phe Thr Ile Ser Val Asn
1 5 10 15

Gly Val Leu Tyr Leu Gln
20

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于智人和小家鼠序列的合成肽

<400> 12

Ser Ser Glu Leu Phe Thr Ile Ser Val Asn Gly Val Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于智人和小家鼠序列的合成肽

<400> 13

Thr Ser Val Phe Leu Asp Asn Ala Ser Gly
1 5 10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于智人和小家鼠序列的合成肽

<400> 14

Ser Leu Thr Val Arg Ser Gly Ser His Phe Ser Ala
1 5 10

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于智人和小家鼠序列的合成肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Xaa 可为任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Xaa 可为任何天然存在的氨基酸

<400> 15

Ser Leu Thr Val Arg Ser Gly Ser His Phe Ser Ala Xaa Leu Leu Gly
1 5 10 15

[0007]

Xaa

<210> 16
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 16

Glu Phe Gln Leu Leu Leu Lys Gly Ala Val Arg Gln Arg Glu Arg Ala
 1 5 10 15

Glu Pro Glu Pro Cys Thr Cys Gly Pro Ala Gly Pro Val Ala Ala Ser
 20 25 30

Leu Ala Pro Val Ser Ala Thr Ala Gly Glu Asp Asp Asp Asp Val Val
 35 40 45

Gly Asp Val Leu Ala Leu Leu Ala Ala Pro Leu Ala Pro Gly Pro Arg
 50 55 60

Ala Pro Arg Val Glu Ala Ala Phe Leu Cys Arg Leu Arg Arg Asp Ala
 65 70 75 80

Leu Val Glu Arg Arg Ala Leu His Glu Leu Gly Val Tyr Tyr Leu Pro
 85 90 95

Asp Ala Glu Gly Ala Phe Arg Arg Gly Pro Gly Leu Asn Leu Thr Ser
 100 105 110

Gly Gln Tyr Arg Ala Pro Val Ala Gly Phe Tyr Ala Leu Ala Ala Thr
 115 120 125

Leu His Val Ala Leu Gly Glu Pro Pro Arg Arg Gly Pro Pro Arg Pro
 130 135 140

Arg Asp His Leu Arg Leu Leu Ile Cys Ile Gln Ser Arg Cys Gln Arg
 145 150 155 160

Asn Ala Ser Leu Glu Ala Ile Met Gly Leu Glu Ser Ser Ser Glu Leu
 165 170 175

Phe Thr Ile Ser Val Asn Gly Val Leu Tyr Leu Gln Met Gly Gln Trp
 180 185 190

Thr Ser Val Phe Leu Asp Asn Ala Ser Gly Cys Ser Leu Thr Val Arg
 195 200 205

Ser Gly Ser His Phe Ser Ala Val Leu Leu Gly Val
 210 215 220

<210> 17
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 17

Met Ala Pro Ala Arg Arg Pro Ala Gly Ala Arg Leu Leu Leu Val Tyr

[0008]

1	5	10	15
Ala Gly Leu	Leu Ala Ala Ala Ala	Ala Gly Leu Gly Ser	Pro Glu Pro
	20	25	30
Gly Ala Pro	Ser Arg Ser Arg Ala Arg Arg	Glu Pro Pro	Pro Gly Asn
	35	40	45
Glu Leu Pro	Arg Gly Pro Gly Glu Ser Arg Ala	Gly Pro Ala Ala Arg	
	50	55	60
Pro Pro Glu	Pro Thr Ala Glu Arg Ala His	Ser Val Asp Pro Arg Asp	
	65	70	75
Ala Trp Met	Leu Phe Val Arg Gln Ser Asp	Lys Gly Val Asn Gly Lys	
	85	90	95
Lys Arg Ser	Arg Gly Lys Ala Lys Lys	Leu Lys Phe Gly Leu Pro Gly	
	100	105	110
Pro Pro Gly	Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly	Pro Ile Ile Pro	
	115	120	125
Pro Glu Ala	Leu Leu Lys		
	130		
<210>	18		
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	基于智人和小鼠序列的合成肽		
<400>	18		
Pro Ser Arg	Val Pro Ala Ala Gln Glu Leu		
1	5	10	

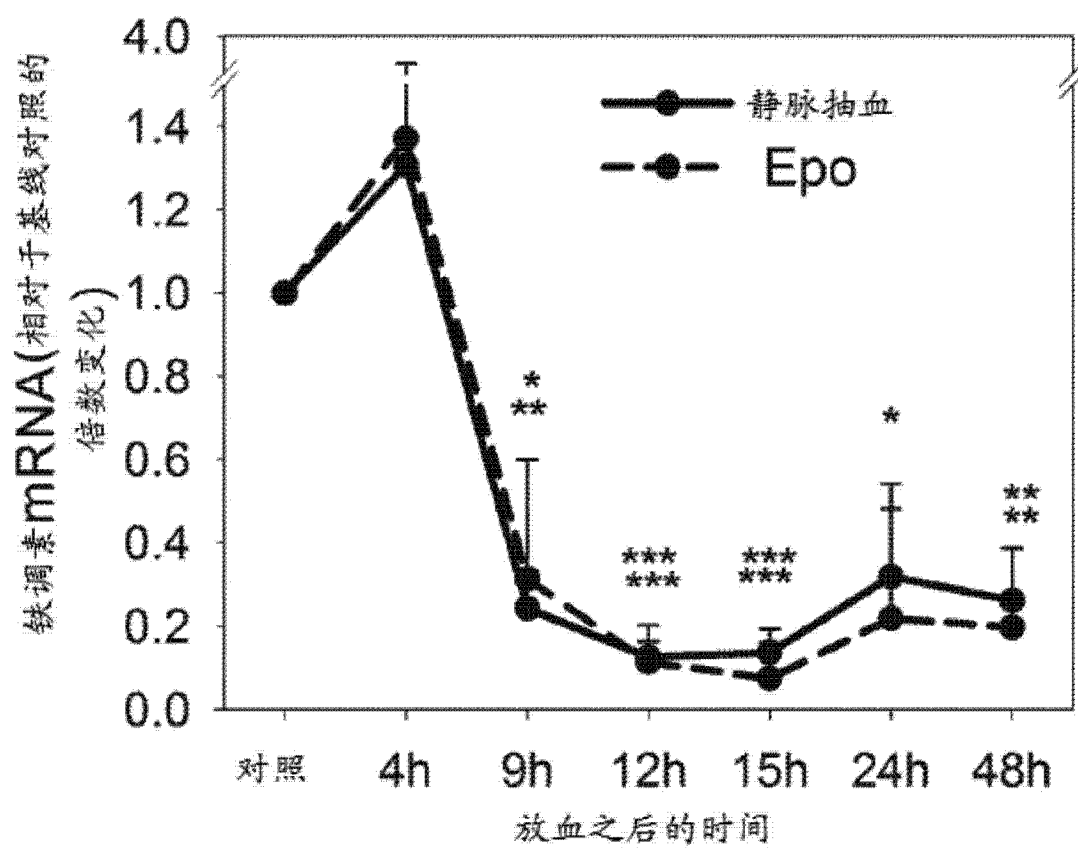


图 1

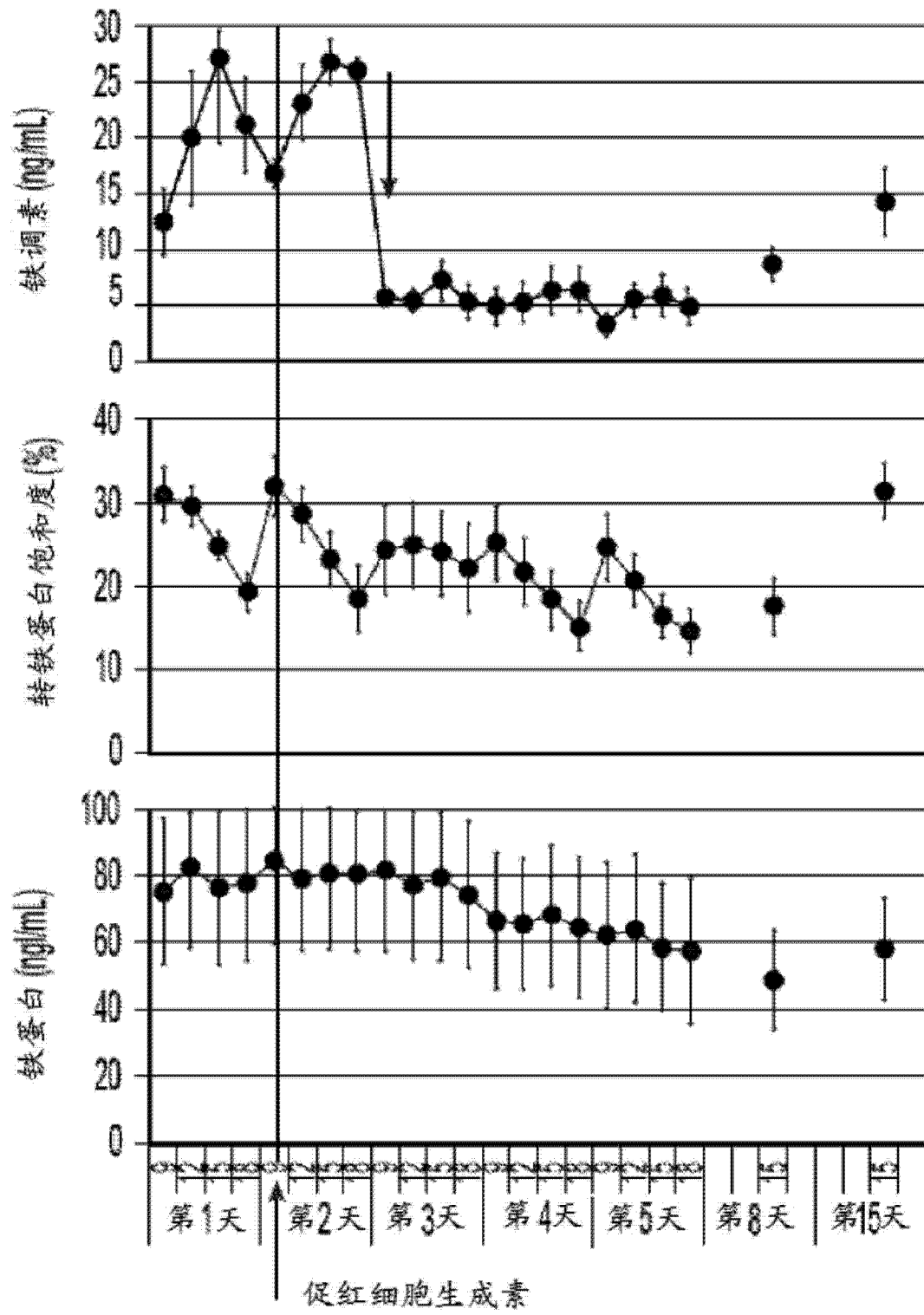


图 2

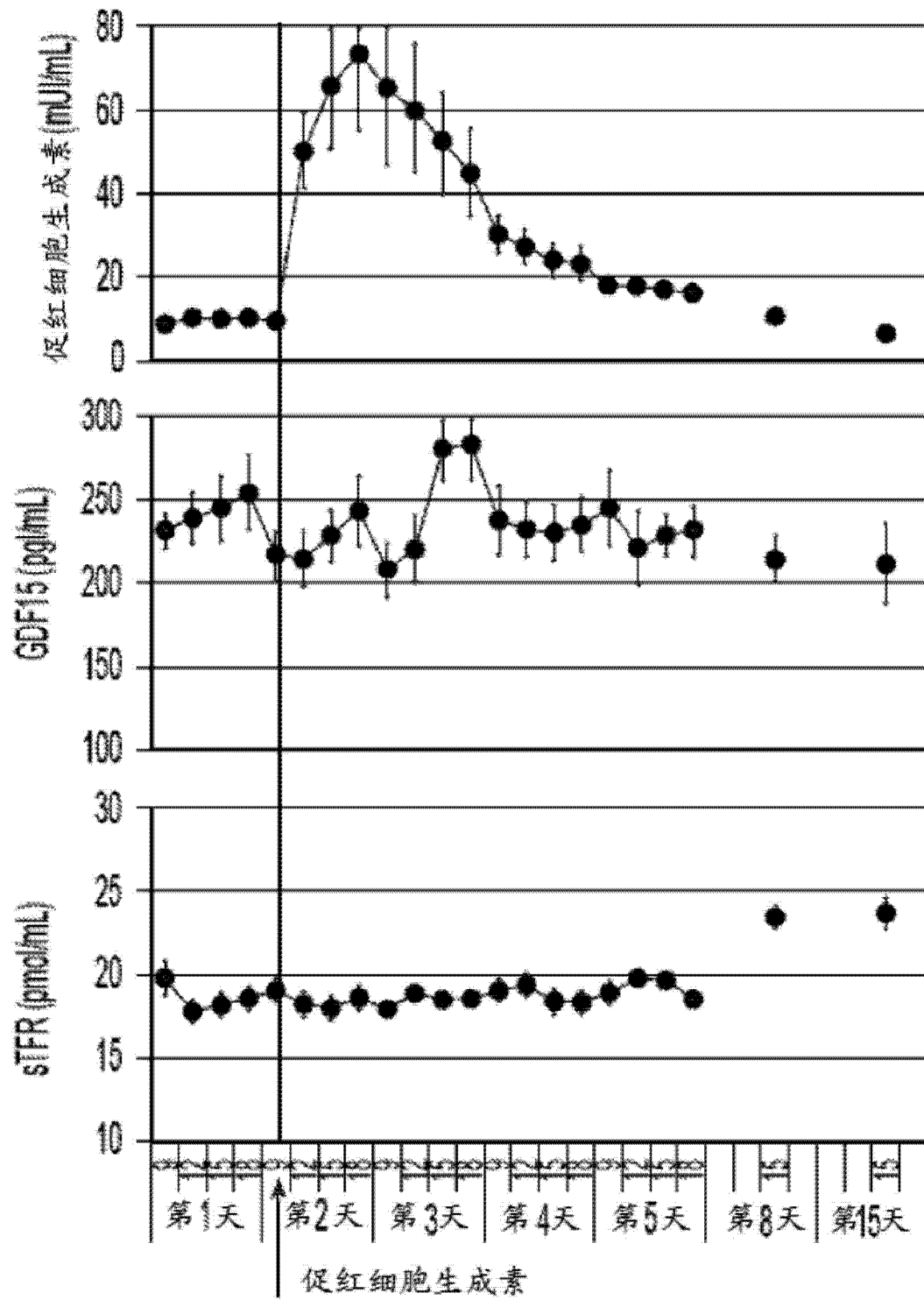


图 2 续

```

1  MAPARRPAGARLLLVYAGLLAAAGLSPGAPSRSRARRPPPGNELPRGPGESRAG 60 Q4GOM1 F132B_HUMAN
1  MASTRRPVGARTLLACASLLAA--MGLGVPESAEPVGTHARP-QPPGAELPA-----P 50 Q6PGN1 F132B_MOUSE
** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
61  PAARPEPTAERAHSVDPDRAWMLEFVRQSDKGVNGKKRSRGKAKKLKFGLPFPFPFPQPQ 120 Q4GOM1 F132B_HUMAN
51  PANSPPEPTIAHAHSVDPDRAWMLEFVKQSDKGINSKRRS--KARRLKLGLPFPFPFPQPQ 108 Q6PGN1 F132B_MOUSE
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
121 GPPGPPIIPPEALLKEFQLLLKGAVRQREAEPEPCTCGPAGPVAASLAPVSATAGEDDDD 180 Q4GOM1 F132B_HUMAN
109 GPPGPFIPSEVLLKEFQLLLKGAVRQRESH-LEHCTRDLTTPASGSPSRVP-AAQELDSQ 166 Q6PGN1 F132B_MOUSE
* :***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
181 VVGDLALLAALAPGPAPRVEAAFLCRLRRDALVERRALHELGVYYLPDAEGAFRRGP 240 Q4GOM1 F132B_HUMAN
167 DPGALLALLAATLAQGPAPRVEAAFHCRLLRDVQVDRRALHELGIYYLPEVEGAFHRGP 226 Q6PGN1 F132B_MOUSE
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
241 GLNLTSGQYRAPVAGFYALAAATLHVALGEPPRRGPPRRDHLRLILICIQSRCORNASLEA 300 Q4GOM1 F132B_HUMAN
227 GLNLTSGQYAPVAGFYALAAATLHVALTEQPRKGPTRRDRRLRLILICIQSLCQHNASLET 286 Q6PGN1 F132B_MOUSE
:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
301 IMGLESSSELFTISVNGVLYLQMGQWTSVFLDNASGCSLTVRSGSHFSVLLGV 354 Q4GOM1 F132B_HUMAN
287 VMGLENSSELFTISVNGVLYLQAGHYTTSVFLDNASGSSLTVRSGSHFSAILLGL 340 Q6PGN1 F132B_MOUSE
:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

```

图 3A

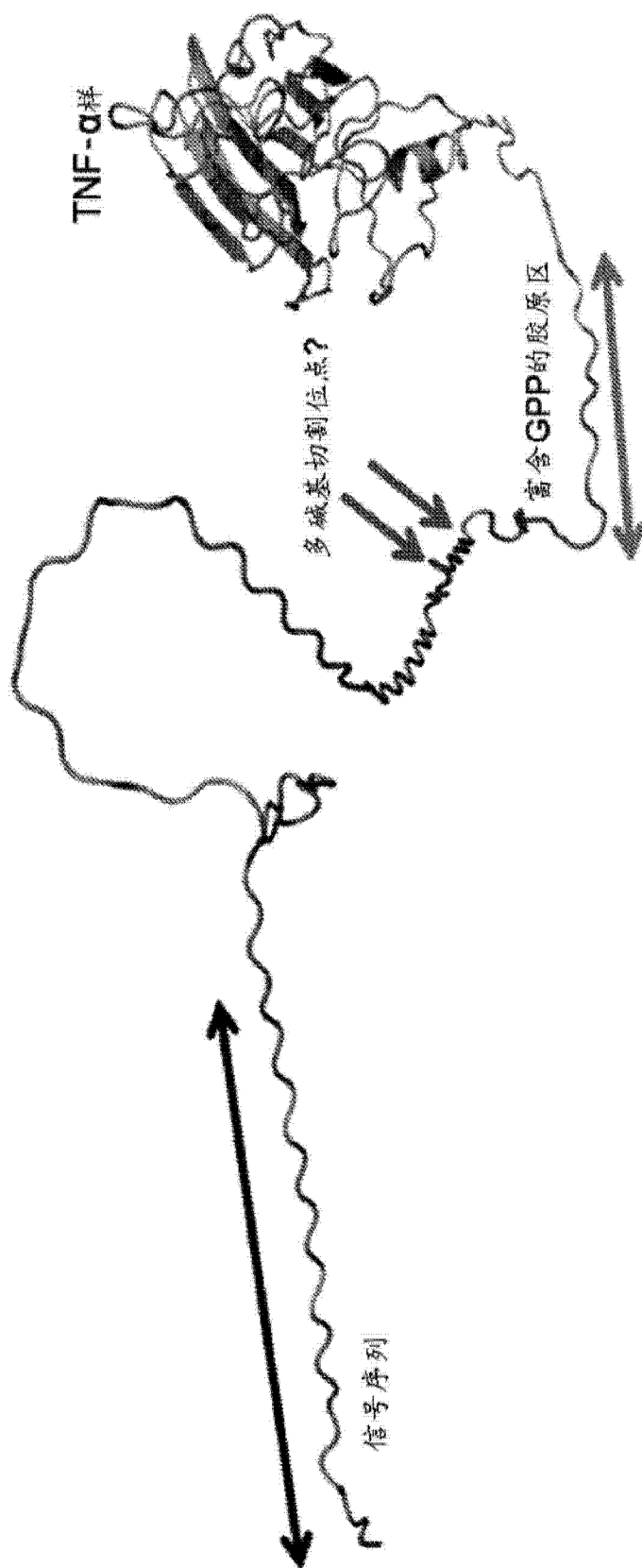


图 3B

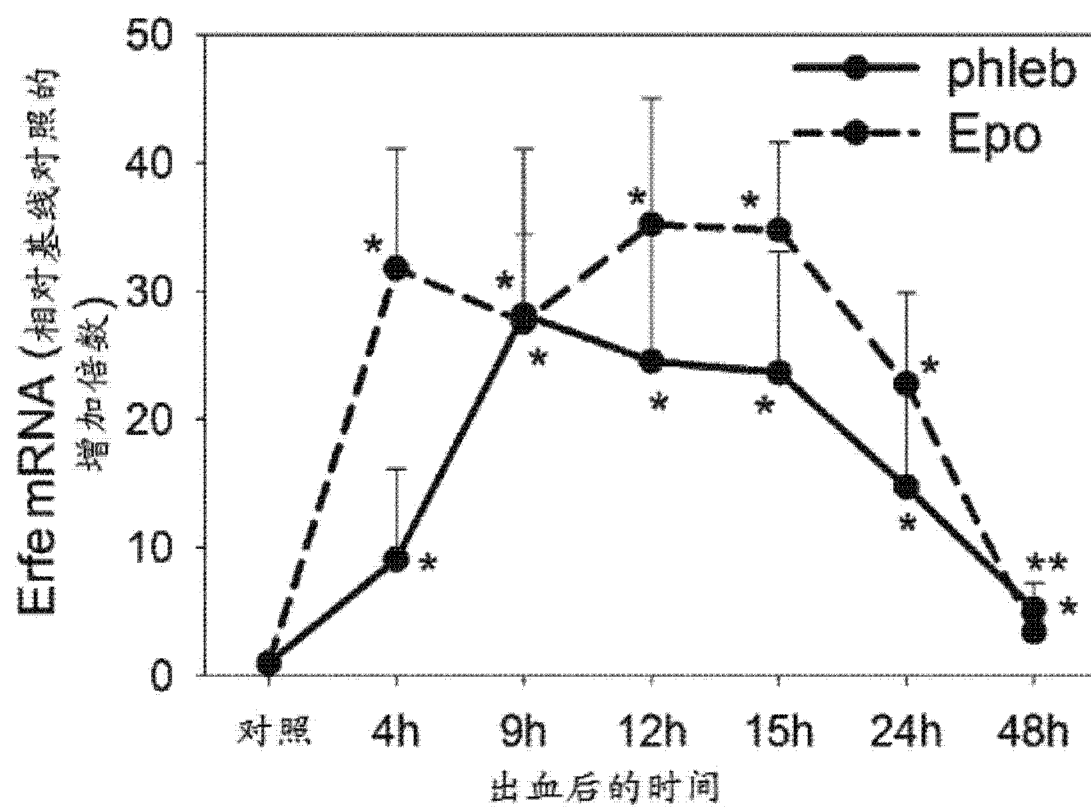


图 4

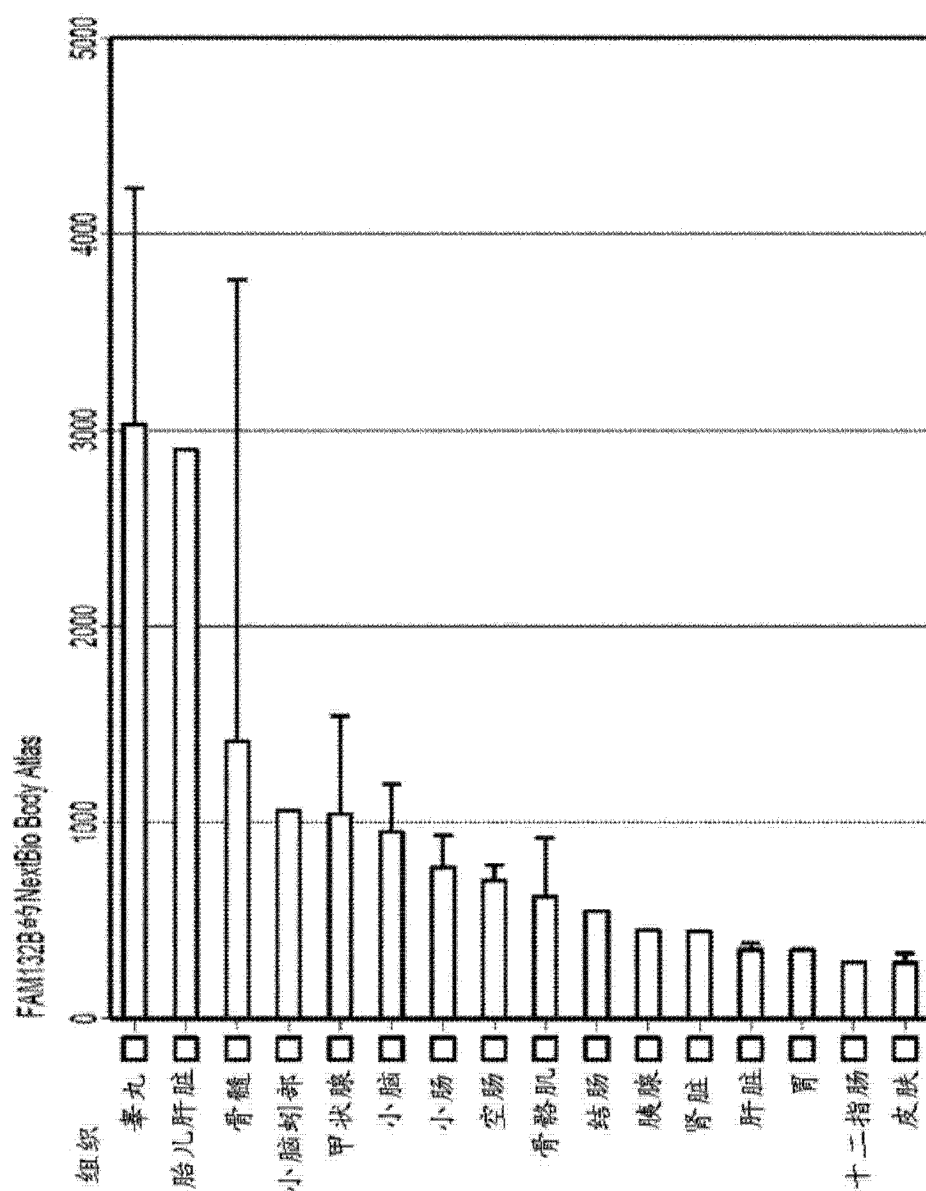


图 5A

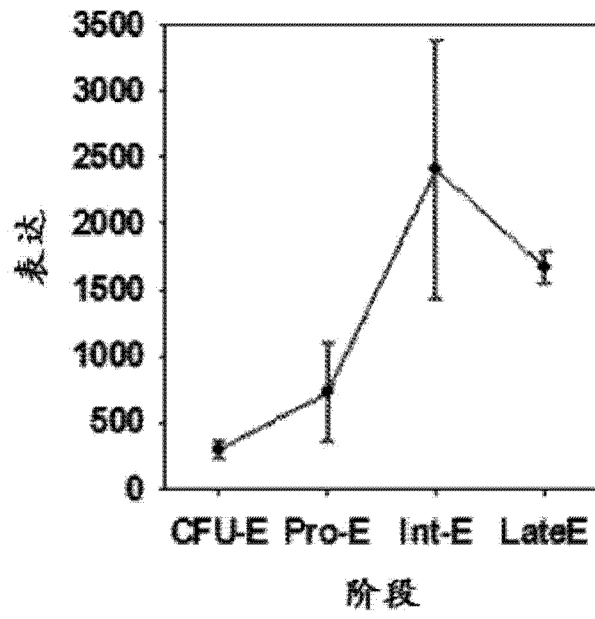


图 5B

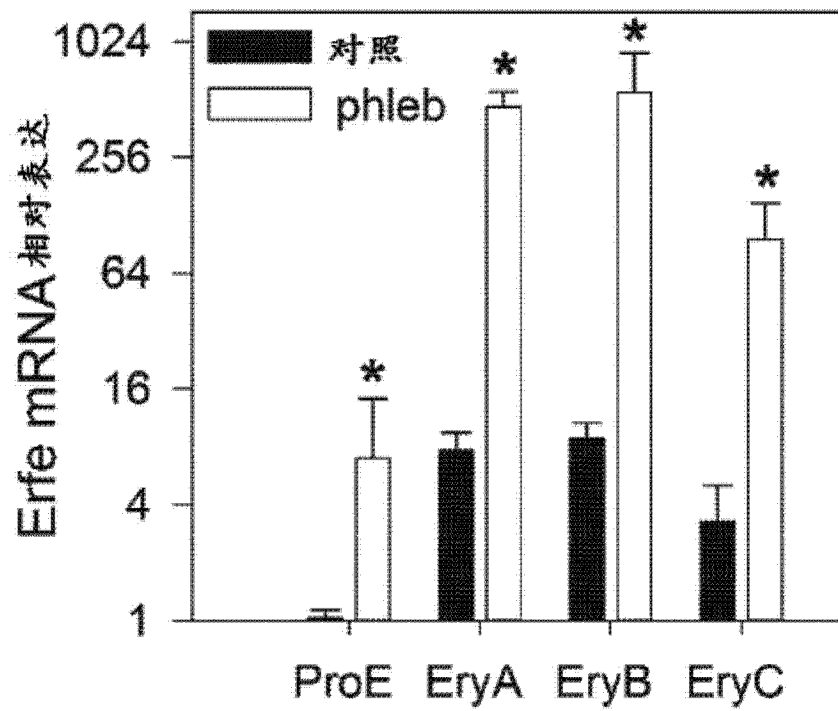


图 6

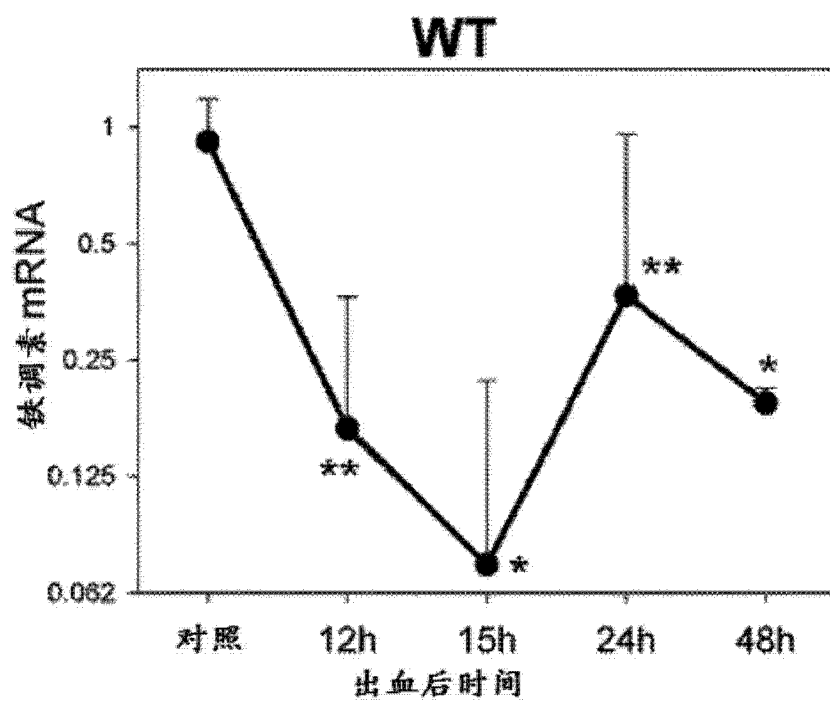


图 7A

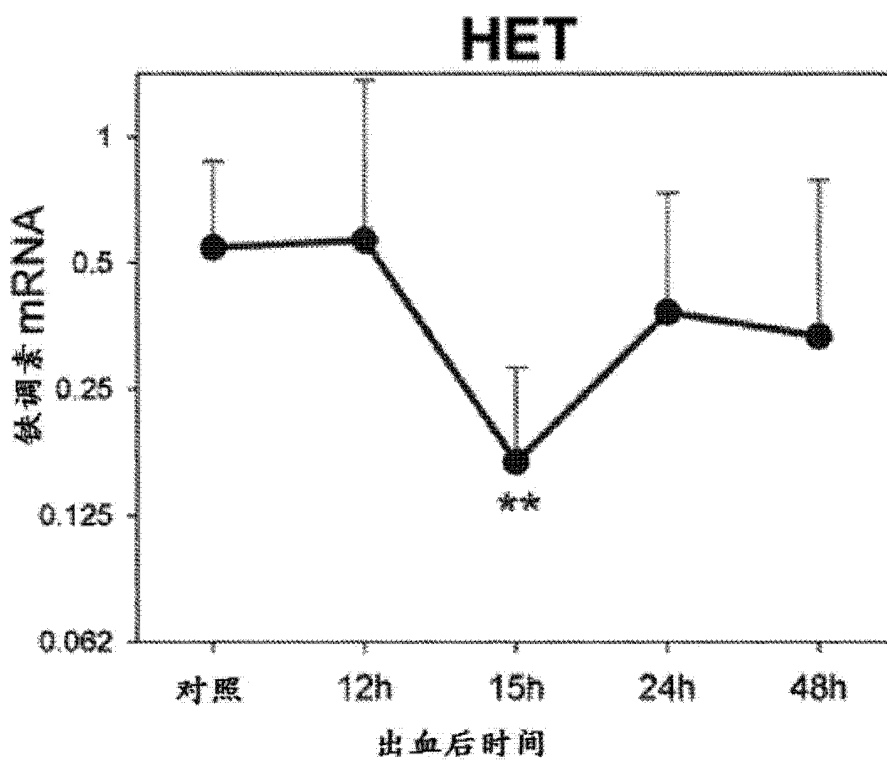


图 7B

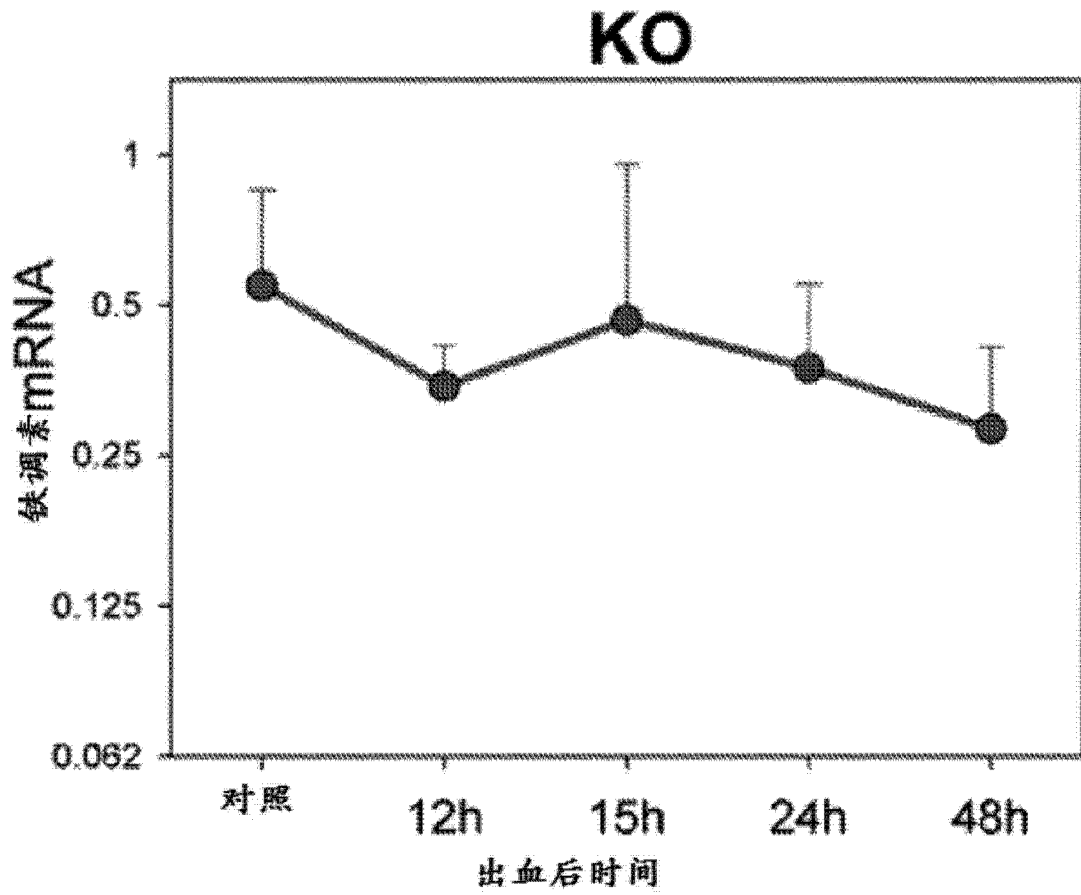


图 7C

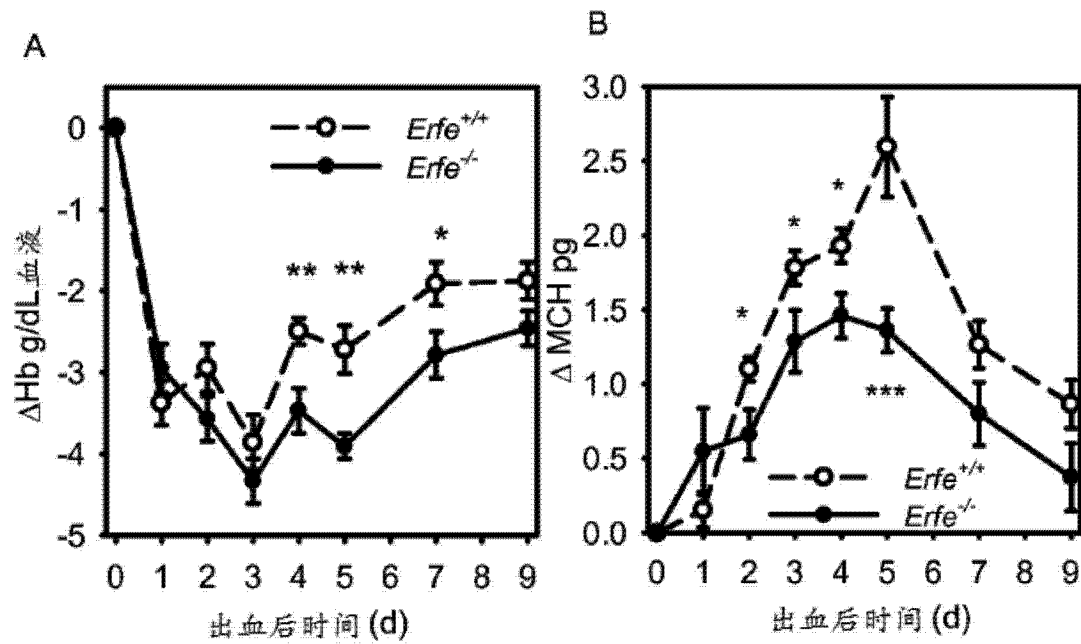


图 8

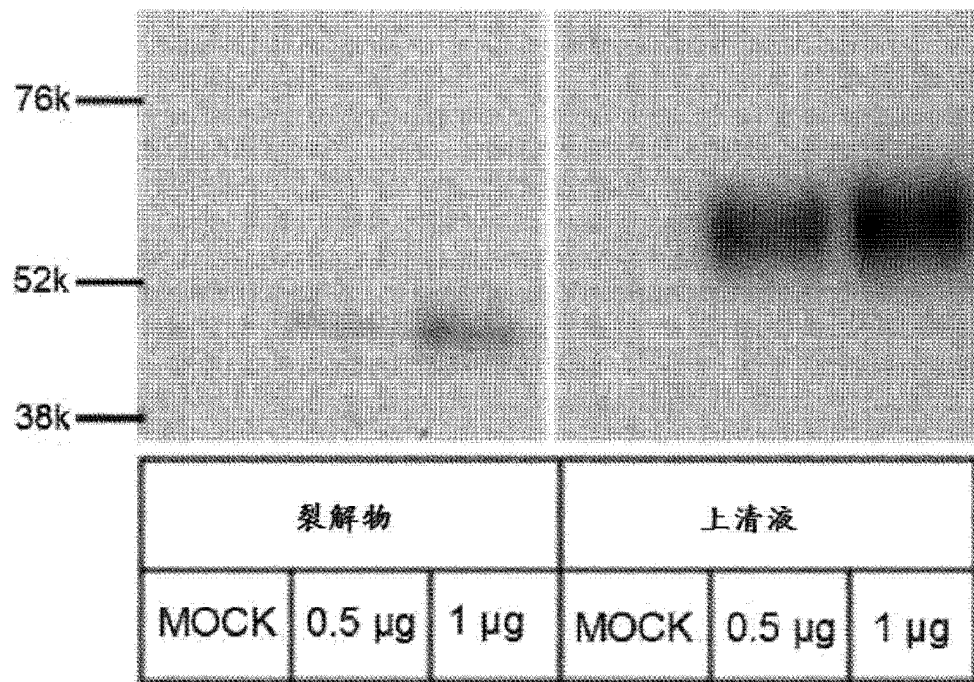


图 9A

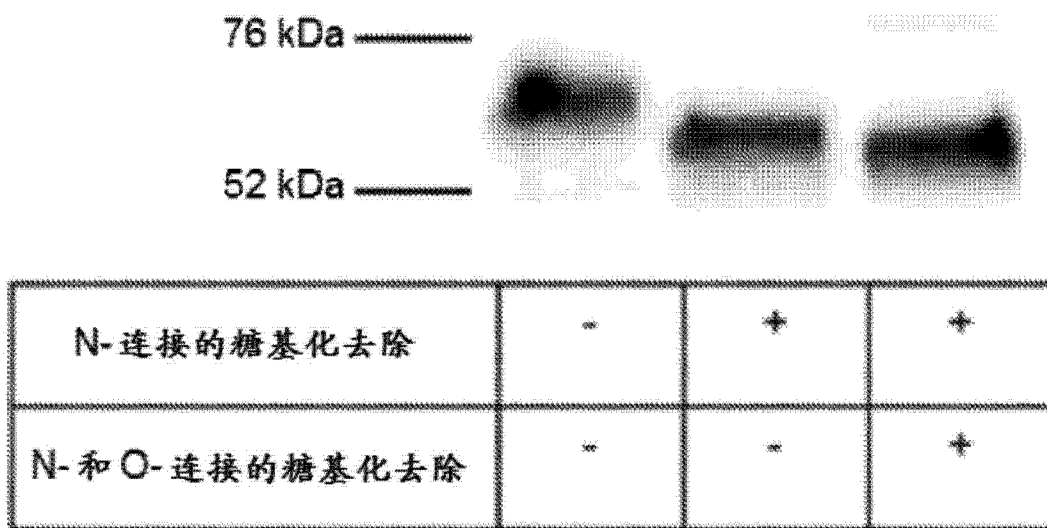


图 9B

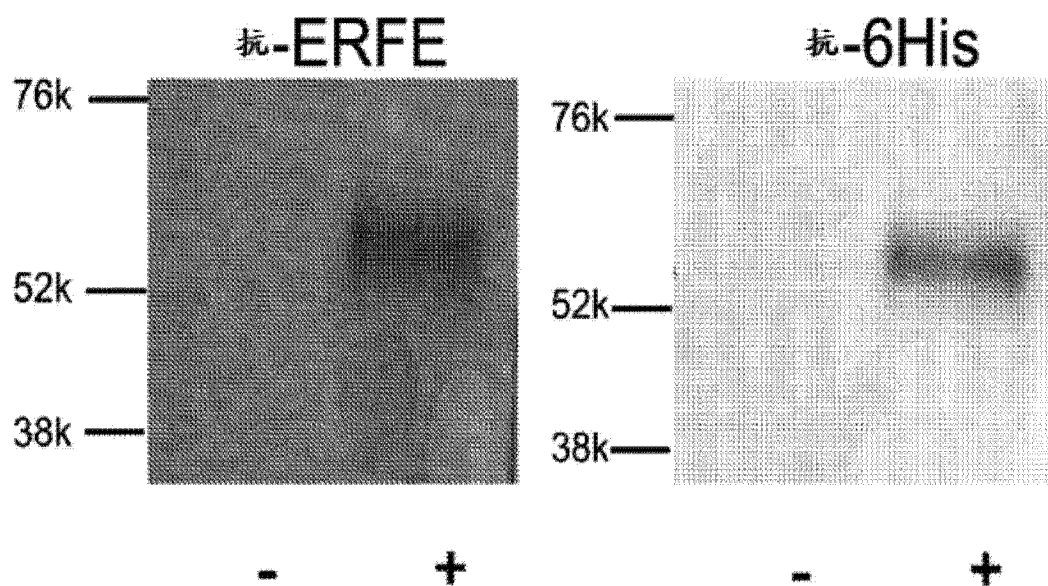


图 9C

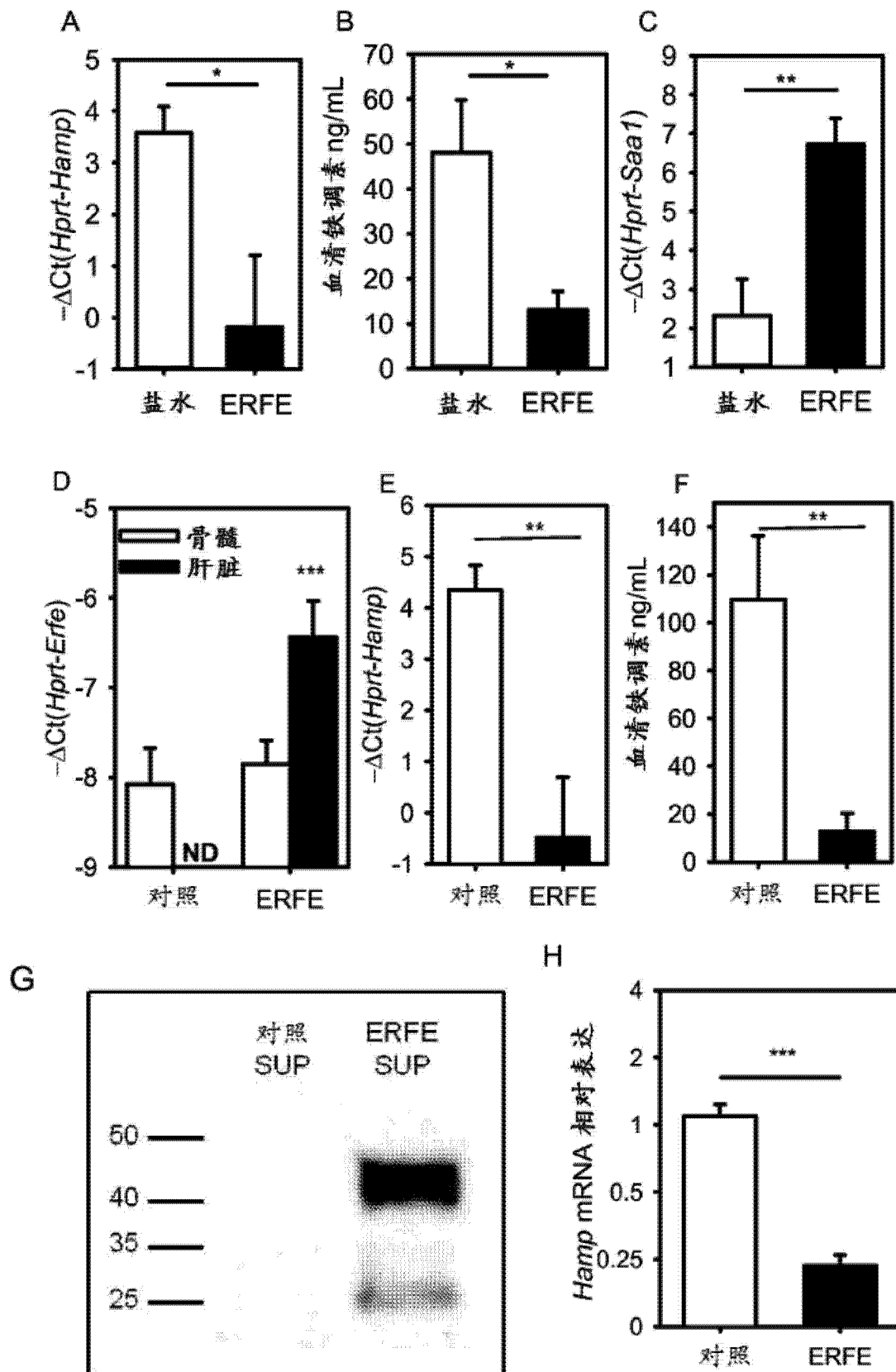


图 10

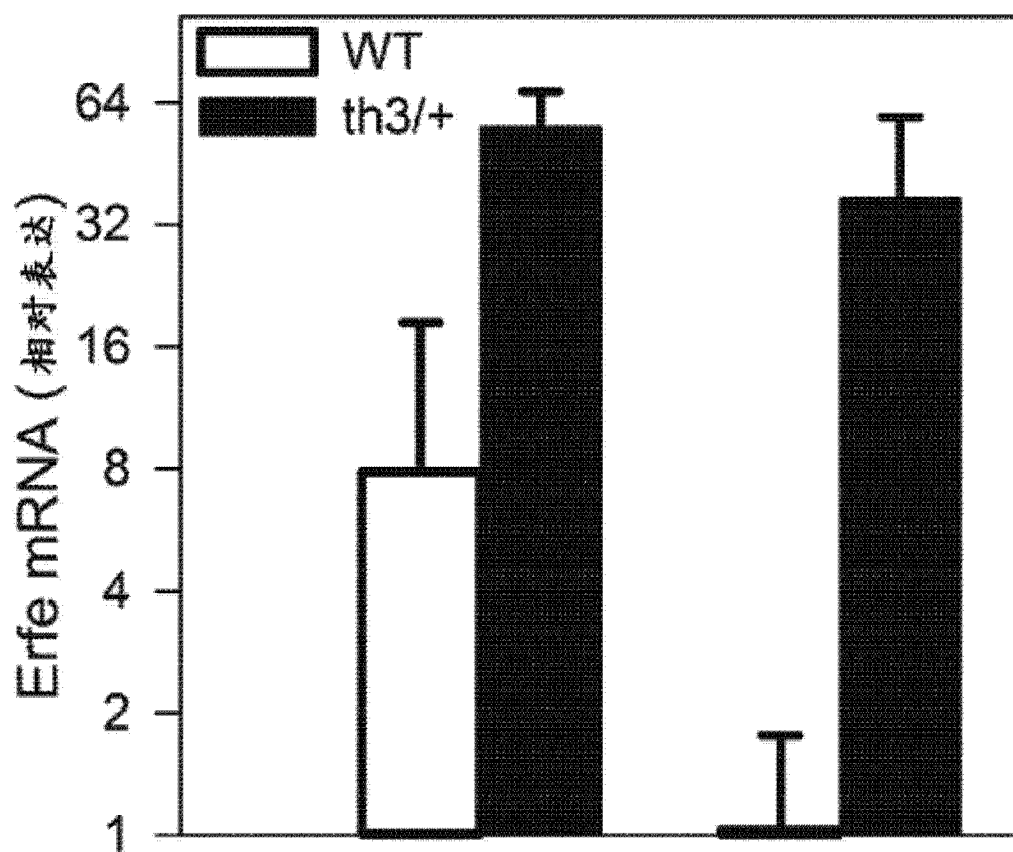


图 11

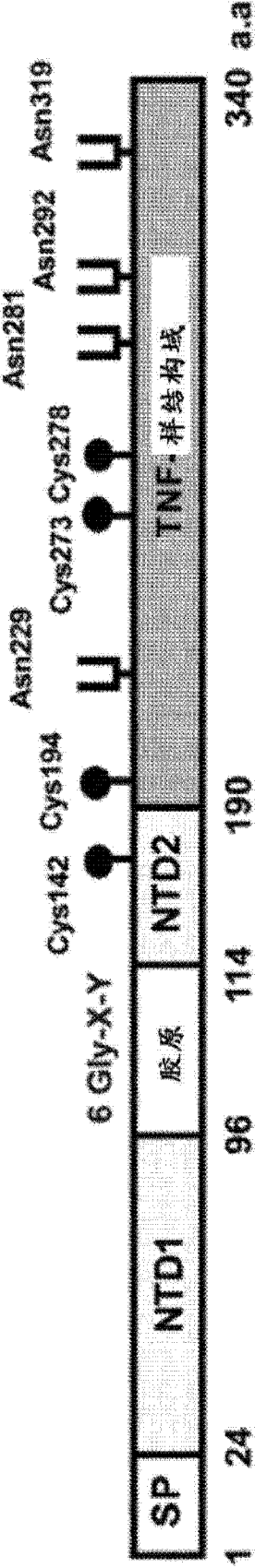


图 12