



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101076730 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 17

(21) 申请号 200380108964. 8

C12P 21/08 (2006. 01)

(22) 申请日 2003. 11. 19

C07K 1/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

10/299, 486 2002. 11. 19 US

10/441, 089 2003. 05. 19 US

(56) 对比文件

WO 0073454 A, 2000. 12. 07, 5-12, 14.

US 5420016 A, 1995. 05. 30, 全文.

Alexander Krause et al..LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. 《FEBS Letters》.2000, 第 480 卷 147-150.

Christina H. Park et al..Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. 《The Journal of Biological Chemistry》.2001, 第 276 卷 (第 11 期), 7806-7810.

Gael Nicolas et al..The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. 《The Journal of Clinical Investigation》.2002, 第 110 卷 (第 7 期), 1037-1044.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005. 07. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2003/036946 2003. 11. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02004/058044 EN 2004. 07. 15

(73) 专利权人 DRG 国际有限公司

地址 美国新泽西州

审查员 石剑平

(72) 发明人 H·库拉克斯茨 C·E·吉钦托夫

A·珍茨科 W·施特雷梅尔

权利要求书1页 说明书38页

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

72001

代理人 张轶东 刘玥

序列表3页 附图10页

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

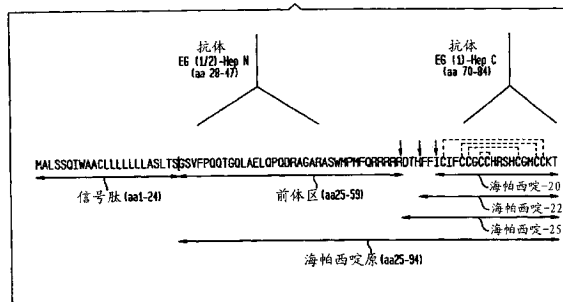
(54) 发明名称

通过筛选人或动物组织、血液或体液中的海帕西啉来诊断疾病的方法, 以及该方法的治疗性用途

西啉和海帕西啉的激动剂或拮抗剂治疗受试者对某些疾病进行的治疗性处理。

(57) 摘要

本发明涉及用于诊断疫病状况的方法和试剂盒, 所述疫病状况特征在于非生理学水平的海帕西啉, 包括海帕西啉原和它的片段, 该方法包括从受试者体内获得组织或流体样品; 让所述样品与能特异性地结合相当于海帕西啉蛋白的中间部分或C末端的多肽的抗体或它的片段接触, 并且利用基于所述抗体和所述多肽的结合的测定来定量海帕西啉水平; 其中, 所述非生理学水平的海帕西啉是所述疾病状况的指示。本发明还涉及用于遗传技术方法中的诊断方法和试剂盒, 如用于超表达或下调海帕西啉。本发明还涉及通过用海帕



CN 101076730 B

1. 抗体在制备用于确定样品中海帕西啉的存在或量的试剂中的用途,所述确定步骤包括让所述样品与所述特异性结合包括在 SEQ ID NO :2 的 28-47 位氨基酸中的中间部分表位或包括在 SEQ ID NO :2 的 70-84 位氨基酸中的羧基末端表位的抗体或它的片段接触,并对所述抗体和 SEQ ID NO :2 的片段之间的复合物进行定量;其中,所述抗体能够在蛋白印迹分析中检测包含 SEQ ID NO :2 的 25-84 位氨基酸的肽。

2. 如权利要求 1 的用途,其中,所述定量包括进行选自下列一组的测定:放射免疫测定,酶联免疫吸附测定,夹心测定,沉淀素反应,凝胶免疫扩散测定,聚集测定,荧光免疫测定,A 蛋白免疫测定和免疫电泳测定。

3. 一种用于检测以非生理学水平的海帕西啉为特征的疾病状况的试剂盒,包括特异性结合包括在 SEQ ID NO :2 的 28-47 位氨基酸中的中间部分表位或包括在 SEQ ID NO :2 的 70-84 位氨基酸中的羧基末端表位的抗体或它的片段,以及直接或间接结合所述抗体或它的片段的试剂,且其中所述抗体能够在蛋白印迹分析中检测包含 SEQ ID NO :2 的 25-84 位氨基酸的肽。

4. 如权利要求 3 的试剂盒,其中,所述抗体或它的片段被固定在支持物上。

5. 如权利要求 3 的试剂盒,其中,所述试剂包括与第一种结合分子复合的 SEQ ID NO :2 的中间部分或羧基末端中的一个或多个。

6. 如权利要求 5 的试剂盒,其中,所述第一种结合分子是生物素。

7. 如权利要求 6 的试剂盒,其中,所述试剂盒还包括与第二种结合分子复合的酶和所述酶的底物。

8. 如权利要求 7 的试剂盒,其中,所述第二种结合分子是链霉抗生物素蛋白。

9. 如权利要求 7 的试剂盒,其中,所述酶是辣根过氧化物酶,并且所述底物包括过氧化物。

10. 抗体或它的片段,其特异性结合包括在 SEQ ID NO :2 的 28-47 位氨基酸中的中间部分表位或包括在 SEQ ID NO :2 的 70-84 位氨基酸中的羧基末端表位,且其中所述抗体能够在蛋白印迹分析中检测包含 SEQ ID NO :2 的 25-84 位氨基酸的肽。

11. 如权利要求 10 的抗体,其能够检测 1-50ng 的 SEQ ID NO :3。

12. 如权利要求 11 的抗体,其能够检测 1ng 的 SEQ ID NO :3。

通过筛选人或动物组织、血液或体液中的海帕西啉来诊断疾病的方法,以及该方法的治疗性用途

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是申请日为 2003 年 5 月 19 日的申请号 10/441,089 的部分继续申请,而后者又是申请日为 2002 年 11 月 19 日的申请号为 10/299,486 的部分继续申请。

背景技术

[0003] 铁是所有活生物生长和发育所必需的必需痕量元素;它是 DNA 合成和多种代谢过程所不可缺少的。不过,铁代谢紊乱与多种重要的哺乳动物疾病相关,包括,但不局限于缺铁性贫血,含铁血黄素沉着症或铁过量疾病血色素沉着病 (Pietrangelo, A. (2002) *Am J Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282, G403-414; Andrews, N. C. (2000) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1, 75-98; Philpott, C. C. (2002) *Hepatology* 35, 993-1001; Anderson 和 Powell (2002) *Int J Hematol* 76, 203-203; Beutler 等, (2001) *Drug-Metab. Dispos.* 29, 495-499)。在生理学条件下,人的铁含量是通过控制吸收调节的。在哺乳动物中,铁的吸收主要是在十二指肠和上部空肠中进行的,并且是铁储存受到生理学控制的唯一的机制 (Philpott, C. C. (2002) *Hepatology* 35, 993-1001)。在吸收之后,铁与循环的运铁蛋白结合,并且送递到整个身体的组织中。在肝脏中,作为铁储存的主要位点,与运铁蛋白结合的铁通过经典的运铁蛋白受体 (TfR1) (Collawn 等 (1990) *Cell* 63, 1061-1072), 并且据推测在更大量上通过最近鉴定的同源运铁蛋白受体 2 (TfR2) (Kawabata 等 (1999) *J Biol Chem* 274, 20826-20832), 通过受体介导的胞吞作用摄取到细胞中。该蛋白的细胞外结构域与 TfR1 的相应部分的同一性为 45% (同前)。TfR2 还可以结合双铁运铁蛋白,并且促进对铁的吸收。业已发现 TfR2 中的突变与某些形式的血色素沉着病相关,证实了 TfR2 在铁体内稳态中的重要作用 (Philpott, C. C. (2002) *Hepatology* 35, 993-1001; Camasehella 等, (2000) *Nat. Genet.* 25, 14-15; Fleming 等, (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10653-10658)。TfR2 主要是在肝脏中表达的 (Fleming 等, (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2214-2219; Subramaniam 等, (2002) *Cell Biochem. Biophys.* 36, 235-239), 不过,确切的细胞定位尚不清楚。

[0004] 存在能够增强在缺铁个体体内的铁吸收的反馈机制,而在铁过量的人体内铁的吸收减弱 (Pietrangelo, A. (2002) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282, G403-414; Philpott, C. C. (2002) *Hepatology* 35, 993-1001; Anderson 和 Powell (2002) *Int J Hematol* 76, 203-203)。不过,在遗传性血色素沉着病 (HH) 中,这种调节机制似乎受到了破坏;尽管铁过量,仍然会从饮食中吸收提高量的铁,并且导致过量的铁在内脏器官中积累,导致器官功能异常和衰竭。对肠对身体铁需求改变的反应的分子机制的理解还很少。在这种背景下,海帕西啉 (hepcidin), 即最近鉴定的哺乳动物肽 (Krause 等 (2000) *FEBS Lett* 489, 147-150; Park 等 (2001) *J Biol Chem* 276, 7806-7810) 被推测为调节铁体内稳态的关键信号传导成分 (Philpott C. C. (2002) *Hepatology* 35, 993-1001; Nicolas 等 (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 4596-4601)。

[0005] 海帕西啉是富含半胱氨酸的小肽,主要是在肝脏中产生的。该分子能调节肠中的铁吸收,并且抑制铁从巨噬细胞中释放。海帕西啉最初是从人血浆和尿中分离的具有抗微生物活性的 25 个氨基酸 (aa) 的肽 (Krause 等 (2000)FEBS Lett489,147-150 ;Park 等 (2001)J Biol Chem276,7806-7810)。随后搜索通过铁调节的肝脏特异性基因鉴定海帕西啉 cDNA,其在小鼠中编码 83aa 的前体,并且在大鼠和人体内编码 84aa 的前体,包括推测的 24aa 的信号肽 (Pigeon 等 (2001)J Biol Chem276,7811-7819)。人海帕西啉的 cDNA 结构暗示了它是作为 84 个氨基酸的前肽原翻译的,对它进行氨基末端加工成为 60 个氨基酸残基的海帕西啉原 (prohepcidin) 肽,将它进一步加工成 25 个氨基酸的海帕西啉肽 (Park 等 (2001))。

[0006] 在表现出铁过量的小鼠体内海帕西啉的表达受到破坏,这是由于定向破坏了上游刺激因子 2 (Usf2) 基因,与 hfe^{-/-}小鼠体内存在的相同表型类似 (NicolasG, 等 (2001)Proc Natl Acad Sci USA98,8780-8785),导致得出了这种肽在铁代谢中发挥关键作用的结论。相反,海帕西啉的超表达显示导致了转基因小鼠的严重的缺铁性贫血 (Nicolas 等 (2002)Proc Natl Acad Sci USA99,4596-4601),表明海帕西啉是铁体内稳态的重要调节剂。另外,最近的研究业已显示在 hfe 剔除的小鼠体内肝脏海帕西啉表达的降低 (Ahmad 等 (2002)Blood Cells Mol Dis29,361-366),并且在海帕西啉肽中的突变与严重的青少年血色素沉着病相关 (Roetto 等 (2003)Nat Genet33,21-22),并且开启了理解铁过量的分子病理的新的前景。不过,海帕西啉在生理学和病理学状况下平衡体内铁储存和饮食铁吸收的机制仍然有待确定。

[0007] 在这一方面,这种肽的细胞定位以及它在各种铁的状态下的调节作用在海帕西啉功能的研究中十分重要。尽管对各种器官中的人和小鼠海帕西啉 mRNA 水平进行的 RNA 印迹分析发现海帕西啉主要是在肝脏中表达的 (Krause 等 (2000)FEBS Lett489,147-150 ;Park 等 (2001)J Biol Chem276,7806-7810 ;Nicolas 等 (2002)Proc Natl Acad Sci USA99,4596-4601),但还没有这种肽的细胞定位的数据。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明涉及海帕西啉对哺乳动物细胞吸收铁的调节,以及海帕西啉和 / 或海帕西啉特异性抗体在诊断与铁代谢紊乱相关的疾病中的用途。本发明的诊断检测试剂盒特别适用于筛选人或动物的全部的群体,并且鉴定患有所述疾病的受试者。

[0010] 本发明的一个方面是用于诊断以非生理学水平的海帕西啉为特征的疾病状况的方法,包括从受试者体内获得组织或流体样品;让所述样品与能特异性地结合来自海帕西啉的中间部分 (20-50 位氨基酸) 或 C-末端 (65-84 位氨基酸) 的多肽结合的抗体或它的片段接触,并且利用基于所述抗体和所述多肽结合的测定对海帕西啉的水平进行定量;其中,所述非生理学水平的海帕西啉是所述疾病状况的指示。在本发明的一个方面,确立了灵敏的诊断方法和试剂盒,使得能够检测人血浆中的海帕西啉原。本发明具有广泛的治疗前景,其中,可以将海帕西啉抗体和诊断方法和试剂盒用于测定海帕西啉,作为在治疗期间和之后上述疾病的发展的参数。

[0011] 本发明的一种实施方案涉及包括海帕西啉原和它的片段在内的海帕西啉蛋白的生成和纯化。本发明的另一种实施方案涉及海帕西啉特异性抗体,或它的片段或变体,后者反过来又可用于免疫测定,以便检测受怀疑的人或动物体内的包括海帕西啉原在内的海帕

西啶蛋白。

[0012] 在本发明的另一个方面,所述海帕西啶诊断方法和试剂盒可用于遗传技术方法,如用于超表达或下调海帕西啶。

[0013] 在本发明的另一个方面,海帕西啶可用于上述疾病的治疗性处理,包括用海帕西啶,和海帕西啶的激动剂或拮抗剂治疗受试者。可以通过改变海帕西啶的浓度,抑制海帕西啶与铁或与 TfR2 受体的结合调节细胞中的铁吸收。因此,海帕西啶,以及海帕西啶的激动剂或拮抗剂可用于治疗存在铁代谢紊乱的状况。例如,所述物质可用于治疗上述疾病。

[0014] 通过阅读以下附图和详述能更好地理解本发明的上述和其他方面。

[0015] 附图简述

[0016] 图 1 表示人海帕西啶前体蛋白的氨基酸序列,包括位于 N-末端的标准的 24aa 的信号肽(24 和 25 位氨基酸之间的线条表示推测的信号序列切割位点),35aa 的前体区,以及 C-末端 20-,22- 和 25-aa 的海帕西啶肽,它们的差别仅在于 N-末端的截短,正如通过箭标表示的。在从海帕西啶前体上切割信号肽之后,产生了由 60aa 组成的海帕西啶原分子。在海帕西啶 25 中的推测的二硫键连接是 1-8,2-7,3-6 和 4-5,正如通过虚线示出的(引自 Hunter 等,20)。正如通过抗体符号所表示的,产生了抗海帕西啶前体 aa28-47 的抗血清 EG(1 和 2)-Hep N,产生了抗 aa70-84 的抗血清 EG(1)-Hep C。

[0017] 图 2 表示以下部分:(A):人肝脏(泳道 2 和 3)和 HepG2 细胞(泳道 4 和 5)的 RT-PCR 分析,表示海帕西啶的基因表达。示出了 bpDNA 梯(泳道 1 和 7)。泳道 6 表示负对照。(B-D):在豚鼠(泳道 1)和人肝脏(泳道 2)以及 HepG2 细胞(泳道 3),人血清(泳道 4)和豚鼠骨骼肌(泳道 5,对照)的提取物中用抗体 EG(1)-HepN(B),EG(2)-HepN(C) 和 EG(1)-HepC(D) 进行的海帕西啶的蛋白印迹分析。注意,用所有抗体获得的位于 10 和 20kDa 的免疫反应性带能识别海帕西啶前体上的不同的表位。(所使用的分子量标记为:磷酸化酶 B,105kDa;谷氨酸脱氢酶,53kDa;碳酸酐酶,34kDa;肌红蛋白-蓝(myoglobin-blue),23kDa;肌红蛋白-红(myoglobin-red),17kDa;溶菌酶,13kDa;抑酶肽,7kDa;胰岛素,3kDa)。

[0018] 图 3 表示通过免疫荧光显微镜术检测 HepG2 细胞中的海帕西啶,使用了抗体 EG(1)-HepN(A),EG(2)-HepN(B) 和 EG(1)-HepC(C)(比例线 8 μm)。

[0019] 图 4 表示海帕西啶在豚鼠(A-F)和人(G-I)肝脏中的细胞定位。用区域特异性抗体 EG(1)-HepN(A, D, G),EG(2)-HepN(B, E, H) 和 EG(1)-HepC(C, F, I) 对石蜡切片进行的免疫染色显示在肝细胞的基底外侧膜区域出现了不同的免疫反应性(箭标)。(放大倍数:A-C, X 180;D-I, X 540)。

[0020] 图 5 表示豚鼠肝脏的免疫组织化学切片:A,抗体 EG(1)-HepN;B,抗体 EG(2)-HepN;C,抗体 EG(1)-HepC,表现出海帕西啶在肝小叶内的明确的带状分布,免疫反应性沿门管周区域(星号)到中央静脉(箭头)减弱。注意,在中央静脉周围的肝细胞中没有出现免疫反应性(B 中的箭标表示门管三联体(portaltriad))(A-C, X 180)。

[0021] 图 10 表示以下部分:(A)人(泳道 2),小鼠(泳道 3)和大鼠(泳道 4)肾的 RT-PCR 分析,表示海帕西啶的基因表达。示出了 bpDNA 梯(泳道 1 和 5)。(B, C)用抗体 EG(2)-HepN(B) 和 EG(1)-HepC(C) 对人(泳道 1),大鼠(泳道 2)和小鼠(泳道 3)肾脏,以及人尿(泳道 4)的提取物中的海帕西啶进行的蛋白印迹分析。注意,用这两种抗体获得的

9.5kDa 的免疫反应性带能识别海帕西啉前体上的不同的表位。(所使用的分子量标记为:磷酸化酶 B,105kDa;谷氨酸脱氢酶,53kDa;碳酸酐酶,34kDa;肌红蛋白-蓝,23kDa;肌红蛋白-红,17kDa;溶菌酶,13kDa;抑酶肽,7kDa;胰岛素,3kDa)。

[0022] 图 11 表示海帕西啉在大鼠肾皮质中的细胞定位。用区域特异性抗体 EG(1)-HepC(A), EG(2)-HepC(B), EG(1)-HepN(C) 和 EG(2)-HepN(D) 对石蜡切片进行的免疫染色显示在肾皮质远端小管中的不同的免疫反应性。在某些小管中,免疫反应性分布在上皮细胞的细胞质内(箭标),但是在其他部位,所述免疫反应性位于各个细胞的顶极(apical pole)上(D,箭头)。注意肾小球(星号)缺乏任何海帕西啉免疫反应性。(放大倍数:A, X 90;B-D, X 180)。

[0023] 图 12 表示海帕西啉在大鼠(A和C)和小鼠(B和D)肾脏中的组织分布。用抗体 EG(2)-HepN 进行的免疫组织化学分析显示外部髓质(outer medulla)(A和B)具有显著减弱的海帕西啉免疫反应性,介于外侧条(outer stripe)(os)和内侧条(inner stripe)(is)之间,它是通过黑色虚弧线表示的。C和D表示在内部髓质(m)缺乏海帕西啉免疫反应性。强的免疫反应性出现在皮质(c)中。(放大倍数:A,B,和D, X 90;C, X 180)。

[0024] 图 13 表示用抗体 EG(1)-HepN(A), EG(2)-HepN(B和D)和 EG(1)-HepC(C) 进行的海帕西啉在大鼠肾脏中的亚细胞定位。在某些远端小管中,海帕西啉免疫反应性分布在上皮细胞的细胞质中(箭标),但是在其他部位,所述免疫反应性主要集中在朝向各个细胞的顶极部位(黑色箭头)。注意肾小球(星号)和近端小管(透明箭头)缺少任何海帕西啉免疫反应性。(放大倍数:A-D, X 360)。

[0025] 图 14 表示海帕西啉在人肾脏中的细胞定位。抗体 EG(1)-HepN(A), EG(2)-HepN(B和D)和 EG(1)-HepC(C) 在肾皮质远端小管中表现出不同的免疫反应性(箭标)。在相同的小管中,存在海帕西啉免疫反应性的细胞间差异,显示有细胞质染色的强的(黑色箭头)和微弱的免疫反应性的(透明箭头)上皮细胞。在肾小球中没有发现免疫反应性(星号)(放大倍数:A-C, X180;D, X360)。

[0026] 图 15 表示用抗体 EG(1)-HepN(A), EG(2)-HepN(B和D)和 EG(2)-Hep C(C) 在人肾脏的远端小管细胞的顶极检测海帕西啉免疫反应性。注意在分泌性上皮细胞顶极出现的强的免疫染色(黑色箭头),某些细胞缺少海帕西啉免疫反应性(透明箭头)。星号表示肾小球(放大倍数:A-C, X180;D, X360)。

[0027] 图 16 表示 22 位健康志愿者(对照)和 22 位患有慢性肾功能不全的患者的静脉血清和尿海帕西啉原浓度值的框状图。方框内的线条表示中位数,而圆圈表示平均值。方框的下部和上部边缘表示第一和第三四分位,触须线表示最小和最大值。虚线表示循环的免疫反应性的海帕西啉原对照组的平均水平(104.2ng/ml)。

[0028] 实施本发明的最佳方式

[0029] 本发明描述了海帕西啉能调节哺乳动物细胞对铁的吸收,并且海帕西啉的非生理学表述导致了与铁代谢紊乱相关的疾病。本文所使用的术语海帕西啉表示海帕西啉原,海帕西啉或其片段。血液中生理学浓度的海帕西啉在大约 50- 大约 150ng/ml 范围内。非生理学浓度低于或高于这一范围。非生理学量的海帕西啉蛋白或其片段与铁代谢紊乱相关,导致了铁的缺乏或过量,如缺铁性贫血;遗传性和非遗传性铁过量疾病,如含铁血黄素沉着症和血色素沉着病或继发性血色素沉着病,aceruloplasminemia, hypotransferrinemia,

无转铁蛋白血病；未确定起因的铁过量疾病，例如，胆囊系统疾病，肝病，特别是酒精性肝病，非酒精性脂肪性肝炎 (steatohepatitis)，和慢性乙型肝炎和丙型肝炎感染；铁利用疾病，例如铁粒幼红细胞贫血，地中海贫血；血液学疾病，如白血病，polyglobulie，大红细胞性贫血，小红细胞性贫血或正常红细胞性贫血，伴随网状细胞增多的贫血，溶血性贫血；由于感染和疾病造成的网状内皮系统紊乱；炎症和感染，包括脓毒病；免疫学疾病和肿瘤，如癌，肉瘤，淋巴瘤，这些疾病会导致非生理学海帕西啉浓度；神经变性病，如阿尔茨海默病和 Wilson 氏病。这一发现使得能够开发对海帕西啉蛋白和它的片段的测定，以及随后的纯化，所述纯化保留了它们的天然构型和生理学活性。本发明部分基于以下发现：在患有某些疾病的患者中，海帕西啉蛋白存在于人或动物的组织，血液和体液中。

[0030] 本发明第一次提供了如下证明，即在患有上述疾病的受试者体内，包括海帕西啉原在内的海帕西啉蛋白，存在于人或动物组织，血液和体液中，其浓度远远超过不是所述疾病的受试者的正常的人或动物体内存在的浓度。这是通过检查来自患者的组织，血液或体液样品，并且检测海帕西啉蛋白和 / 或海帕西啉原的存在和量而实现的。根据本发明在组织，血液或体液中包括海帕西啉原或其片段在内的任何海帕西啉蛋白的检测和定量测量可用于在受影响的患者以及在随后的病程中证实上述疾病的临床诊断。本发明还可用于在用试剂治疗期间和之后监控所述疾病，其中检验所述试剂稳定，减弱或预防所述疾病发生的能力。

[0031] 仅仅是出于说明目的，本发明将通过以下方式说明：(a) 生成包括海帕西啉原或其片段在内的海帕西啉蛋白；(b) 生成能特异性地结合包括海帕西啉原或其片段在内的海帕西啉蛋白的抗体；(c) 用于诊断所述疾病的亚型或监测所述疾病的诊断测定和试剂盒；(d) 用于超表达或下调海帕西啉或海帕西啉原的方法；和 (e) 所述疾病的治疗性处理。

[0032] 在本发明的一个方面，申请人提供了用于确定海帕西啉在生理学条件和在相关疾病中的作用的方法。在本发明的另一个方面，申请人提供了抗海帕西啉前体分子的中间部分和 C 末端的特异性抗体。在本发明的这一方面，所述抗体被用于确定海帕西啉在人和豚鼠肝脏中的细胞定位。确立了敏感的 ELISA 方法，它能检测患有 HH，慢性肾机能不全 (CRI) 和肾贫血 (RA) 的患者的人血清中的海帕西啉原。申请人业已描述，海帕西啉原是通过肝细胞基底外侧膜释放到血液中的，并且受到了肾清除。由于海帕西啉的血清水平在 HH 和慢性 RA 中被显著下调，所以海帕西啉在受所述疾病的病理生理学过程中必然发挥作用。

[0033] 海帕西啉蛋白的生产

[0034] 从血液和体液中分离海帕西啉蛋白

[0035] 对于本发明来说，术语海帕西啉蛋白被定义为与由 Pigeon 和他的同事公开的推测的氨基酸序列共有大约 80% 氨基酸序列同一性的任何哺乳动物海帕西啉多肽 ((2001) J. Biol. Chem. 276, 7811-7819)。本发明所提供的海帕西啉蛋白包括海帕西啉原，海帕西啉和它的片段。本发明所提供的海帕西啉蛋白还包括具有以下特征的蛋白：氨基酸序列类似于纯化的海帕西啉蛋白的氨基酸序列，不过在它上面天然提供了或人为工程化产生了修饰。例如，海帕西啉肽或 DNA 序列上的修饰可以由本领域技术人员采用已知技术产生。海帕西啉蛋白序列上的目标修饰可以包括在编码序列上所选氨基酸残基的改变，取代，置换，插入或缺失。例如，可以缺失一个或多个半胱氨酸残基或用另一个氨基酸取代，以便改变该分子的构象。用于所述改变，取代，置换，插入或缺失的技术为本领域技术人员所熟知（参

见,例如,美国专利号 4,518,584)。所述改变,取代,置换,插入或缺失优选保留了所述蛋白的需要的活性。对蛋白功能重要的海帕西啉蛋白的区域是通过本领域公知的各种方法确定的,包括丙氨酸扫描方法,它包括用丙氨酸系统地取代一个或一串氨基酸,然后检测所得到的包括丙氨酸的变体的生物学活性。这种类型的分析确定了被取代的氨基酸在生物学活性上的重要性。

[0036] 海帕西啉蛋白的生产可以通过如下方法实现,即采用本领域技术人员所公知的标准技术,通过从患有血色素沉着病,缺铁性贫血,含铁血黄素沉着症,肝硬化和本文所描述的其他此类疾病的人或动物的组织,血液或体液中分离海帕西啉蛋白。在本发明中所包括的所述技术还涉及用于生产海帕西啉蛋白的方法,包括在合适的培养基中生长宿主细胞培养物,并且从所述细胞或生长所述细胞的培养物中纯化海帕西啉蛋白。

[0037] 可以将本领域公知的多种方法用于获得本发明的任意一种分离的海帕西啉蛋白。例如,海帕西啉蛋白还可以通过海帕西啉蛋白的氨基酸序列的化学合成产生 (Pigeon 等, (2001) *J. Biol. Chem.* 276,7811-7819),所述氨基酸序列是根据编码海帕西啉蛋白的 cDNA 的克隆和测序推测的。可以将该海帕西啉蛋白序列信息用于预测要化学合成的海帕西啉蛋白的片段的合适的氨基酸序列,所述化学合成采用本领域公知的肽合成方法。所述方法包括由 R. Bruce Merrifield 设计的固相方法 (Erickson 和 Merrifield, "Solid-Phase Peptide Synthesis", in *The Proteins*, Volume 2, H. Neurath & R. Hill (Eds.) Academic Press, Inc., New York pp. 255-257; Merrifield, (1986) "Solid Phase synthesis", *Science*, 242 :341-347)。在上述固相方法中,将氨基酸逐步添加到与诸如聚苯乙烯珠的不溶性基质连接的生长中的肽链上。这种方法的主要优点是,在每一个阶段需要的产物都结合在能够快速过滤和洗涤的珠上,因此消除了对纯化中间产物的需要。所有反应都是在一个容器中进行的,由此消除了由于重复的转移产物所导致的损失。这种化学肽合成的固相方法可方便地自动化,使得它能够以良好的产量和纯度常规地合成包括大约 50 个残基的肽 (Stewart 和 Young, (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed., Pierce Chemical Co.; Tam 等, (1983) *J. Am. Chem. Soc.*, 105 :6442)。例如,可以合成相当于 SEQ ID NO :2 的氨基酸残基 1-50 或 34-84 的海帕西啉蛋白片段。在最简单的水平上,可通过商业渠道获得的肽合成仪特别适合用于生产海帕西啉蛋白的小的肽和片段。例如,片段可用于生成抗天然海帕西啉蛋白的抗体。

[0038] 本领域技术人员可方便地采用用于分离蛋白的已知方法,以便获得本发明的分离的海帕西啉蛋白/肽之一。这些方法包括,但不局限于,免疫层析, HPLC, 大小排阻层析, 离子交换层析, 和免疫亲和层析。参见,例如, Scopes, *Protein Purification :Principles and Practice*, Springer-Verlag (1994); Sambrook, 等, in *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*; Ausubel 等, *Current Protocols in Molecular Biology*。

[0039] 最后,采用一个或多个反相高效液相层析 (RP-HPLC) 步骤进一步纯化海帕西啉蛋白,所述步骤利用疏水性 RP-HPLC 介质,例如,具有甲基或其他脂族基团的侧基的硅胶。还可以将以各种方式组合的上述某些或所有纯化步骤用于提供基本上均一的分离的重组海帕西啉蛋白。由此纯化的海帕西啉蛋白基本上不含其他哺乳动物蛋白,并且按照本发明被定义为分离的蛋白。

[0040] 海帕西啉蛋白的序列可以利用蛋白测序的 Edman 降解方法鉴定。该方法每次从

肽的氨基末端去掉一个氨基酸残基,用于随后通过层析方法进行序列鉴定。参见,例如,描述于以下文献中的技术:Konigsberg 和 Steinman, (1977) *Strategy and Methods of Sequence Analysis*, in Neurath and Hill (eds.), *The Proteins* (3rd ed.) Vol. 3, pp. 1-178, Academic Press. 另外,按照描述的技术,通过使用自动化液相氨基酸测序仪可以加快对海帕西啉蛋白的序列分析 (Hewick 等, (1981) *J. Biol. Chem.*, 256 :7990-7997 ;Stein 和 Undefriend, (1984) *Analy. Chem.*, 136 :7-23), 以便可以对皮摩尔量的海帕西啉蛋白进行分析。

[0041] 可以将所述纯化的海帕西啉蛋白用于为本领域技术人员所熟知的体外结合测定,以便鉴定能结合海帕西啉蛋白的分子。所述分子包括,但不局限于,例如,小分子,来自组合文库的分子,抗体或其他蛋白。然后检测在所述结合测定中鉴定的分子在本领域所熟知的体内组织培养物或动物模型中的激动剂或拮抗剂活性。简单地讲,将所述分子滴定到多种细胞培养物或动物中,然后检测细胞 / 动物死亡或动物 / 细胞延长的存活。

[0042] 另外,所述结合分子可以与毒素,例如,蓖麻毒蛋白或霍乱毒素,或与对细胞有毒的其他化合物复合。然后通过所述结合分子对海帕西啉蛋白的特异性将所述毒素结合分子复合物导向肿瘤或其他细胞。

[0043] 重组海帕西啉蛋白的克隆和表达

[0044] 在其他实施方案中,海帕西啉蛋白的生产可以通过重组 DNA 技术完成。例如,可以合成合适的海帕西啉核苷酸编码序列,将其克隆并且在合适的宿主细胞中表达。由于编码海帕西啉蛋白的 DNA 序列是已知的 (Pigeon 等, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 7811-7819), 所以可以通过本领域公知的多种方法合成 DNA 探针,以便筛选来自患有血色素沉着病,缺铁性贫血,含铁血黄素沉着症,肝硬化和本文所描述的其他疾病的人或动物受试者的肝组织制备的 cDNA 文库,以寻找特异性海帕西啉蛋白 cDNA。还可采用本领域技术人员所熟知的方法将所述 DNA 探针用于从所述 cDNA 文库中分离整个海帕西啉蛋白基因家族。参见,例如,描述于以下文献中的技术:Maniatis 等, (1982) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., Chapter 7。

[0045] 通过使用标记过的混合的合成的寡核苷酸探针,将杂交方法用于筛选重组克隆,其中,每一种探针都是杂交样品中特定 DNA 序列的潜在的完整互补体,所述样品包括变性的双链 DNA 异质的混合物。为了进行所述筛选,杂交优选在单链 DNA 或变性的双链 DNA 上进行。通过使用用于避免非特异性结合的严格杂交条件,可能,例如,通过让所述靶 DNA 与所述混合物中的作为它的完全互补体的单一探针杂交使得特定的 DNA 克隆能够进行放射自显影显现 (Wallace, 等, (1981) *Nucleic Acids Research*, 9 :879)。

[0046] 另外,可以使用所述蛋白的抗体间接筛选表达文库,以便寻找具有至少一个表位的海帕西啉蛋白。所述抗体可以是以多克隆或单克隆方式产生的,并且用于检测指示海帕西啉蛋白存在的表达产物。一般,按照描述于以下文献中的方法构建 λ gt11 文库,并且进行免疫学筛选:Huynh, 等, (1985) (参见 *DNA Cloning: A Practical Approach*, D. M. Glover, ed., 1 :49)。

[0047] 编码海帕西啉蛋白的特定 DNA 序列的开发还可以通过以下方法获得:(1) 从基因组 DNA 中分离双链 DNA 序列,和 (2) 化学生产 DNA 序列,以便提供目标蛋白的必需密码子。

[0048] 可以利用聚合酶链反应 (PCR) 技术扩增海帕西啉家族的单个成员,以便随后克隆

并且表达海帕西啉蛋白 cDNA (例如, 参见美国专利号 4, 683, 202 ; 4, 683, 195 ; 4, 889, 818 ; Gyllensten 等, (1988) Proc. Nat' l Acad. Sci. USA, 85 : 7652-7656 ; Ochman 等, (1988) Genetics, 120 : 621-623 ; Triglia 等, (1988) Nucl. Acids. Res., 16 : 8156 ; Frohman 等, (1988) Proc. Nat' l Acad. Sci. USA, 85 : 8998-9002 ; Loh 等, (1989) Science, 243 : 217-220).

[0049] 可以将本领域技术人员所熟知的方法用于构建表达载体, 该载体包括海帕西啉蛋白或其片段的编码序列, 以及合适的转录 / 翻译控制信号。所述方法包括, 体外重组 DNA 技术, 合成技术和体内重组 / 遗传重组。参见, 例如, 描述于以下文献中的技术 : Maniatis 等, 1982, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., Chapter 12.

[0050] 有多种宿主 - 表达载体系统可用于表达海帕西啉蛋白或其片段。其中包括, 但不局限于用包括海帕西啉蛋白或其片段的编码序列的重组噬菌体 DNA, 质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化过的微生物, 如细菌 ; 用包括海帕西啉蛋白或其片段的编码序列的重组酵母表达载体转化过的酵母 ; 用包括海帕西啉蛋白或其片段的编码序列的重组病毒表达载体 (例如, 杆状病毒) 感染的昆虫细胞系统 ; 或用包括海帕西啉蛋白或其片段的编码序列的重组病毒表达载体 (例如, 腺病毒, 痘苗病毒) 感染过的动物细胞系统。

[0051] 上述表达载体的表达元件的强度和特异性有所不同。依赖于所使用的宿主 / 载体系统, 多种合适的转录和翻译元件中的任意一种, 包括组成型和诱导型启动子, 都可用于所述表达载体中。例如, 当在细菌系统中克隆时, 可以使用诱导型启动子, 如噬菌体 λ 的 pL, plac, ptrp, ptac (ptrp-lac 杂合启动子) 等 ; 当在昆虫细胞系统中克隆时, 可以使用诸如杆状病毒多角体蛋白启动子的启动子 ; 当在哺乳动物细胞系统中克隆时, 可以使用诸如腺病毒晚期启动子或痘苗病毒 7.5K 启动子的启动子。还可以将通过重组 DNA 或合成技术生产的启动子用于提供插入的海帕西啉蛋白或其片段的编码序列的转录。

[0052] 在酵母中, 有多种包括组成型或诱导型启动子的载体可供使用。有关综述可以参见, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, (1988) Ed. Ausubel 等, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience Ch. 13 ; Grant 等, (1987) Expression and Secretion Vectors for Yeast, in Methods in Enzymology, Eds. Wu & Grossman, (1987) Acad. Press, N. Y., Vol. 153, pp. 516-544 ; Glover, (1986) DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash., D. C. Ch. 3 ; 和 Bitter, (1987) Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, Eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N. Y., Vol. 152, pp. 673-684 ; 和 The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, (1982) Eds. Strathern 等, Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II。为了在酵母中进行互补测定, 可以将海帕西啉蛋白或其片段的 cDNA 克隆到酵母附加体质粒 (YEp) 上, 由于酵母 2 μ 环 (mu circle) 的存在, 所以所述质粒能够在酵母中自主地复制。可以将海帕西啉蛋白或其片段序列克隆到的诸如 ADH 或 LEU2 的组成型酵母启动子或诸如 GAL 的诱导型启动子的后面 (Cloning in Yeast, Ch. 3, R. Rothstein (1986) In DNA Cloning Vol. II, A Practical Approach, Ed. DM Glover, IRL Press, Wash., D. C.)。构建体可以包括同源海帕西啉蛋白 mRNA 的或相当于酵母基因的 5' 和 3' 非翻译区。YEp 质粒能够以高效率转化, 并且所述质粒是极其稳定的。可以使用其他载体, 这些载体能够促进外源 DNA 序列整合到酵母染色体上。

[0053] 可用于表达海帕西啉蛋白或其片段的一种特别好的表达系统是昆虫系统。在一种

这样的系统中,将苜蓿丫纹夜蛾 (*Autographa californica*) 核型多角体病毒 (AcNPV) 用作表达外源基因的载体. 所述病毒能在草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞中生长. 可以将海帕西啉蛋白或其片段的编码序列克隆到所述病毒的非必需区 (例如,多角体蛋白基因) 并且置于 AcNPV 启动子 (例如,多角体蛋白启动子) 的控制之下. 多角体蛋白基因的成功插入,导致了非封闭型重组病毒的生产 (即,缺少由多角体蛋白基因编码的蛋白外壳的病毒). 然后将所述重组病毒用于感染草地夜蛾细胞,在所述细胞中表达插入的基因 (例如,参见 Smith 等, (1983) *J. Biol.*, 46 :586 ;Smith, 美国专利号 4, 215, 051)。另外,用于杆状病毒 / 昆虫细胞表达系统的材料和方法能够以试剂盒形式通过商业渠道获得,例如,从 Invitrogen, San Diego, Calif., 美国获得 (the MaxBat™ 试剂盒), 并且所述方法为本领域所熟知,正如 Summers 和 Smith 所描述的, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555* (1987), 该文献被收作本文参考。在本文中,能够表达本发明的海帕西啉多核苷酸的昆虫细胞是转化过的。

[0054] 在将腺病毒用作表达载体的情况下,海帕西啉蛋白或其片段的编码序列可以与腺病毒转录 / 翻译控制复合物连接,例如,晚期启动子和三联前导序列. 然后通过体内或体外重组将该嵌合基因插入腺病毒基因组中. 插入所述病毒基因组的非必需区 (例如,E1 或 E3 区),能得到活的并且能够在受感染的宿主中表达海帕西啉蛋白或其片段的重组病毒 (例如,参见 Logan&Shenk, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (USA) 81 :3655-3659)。另外,可以使用痘苗病毒 7.5K 启动子 (例如,参见 Mackett 等, (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (USA) 79 :7415-7419 ;Mackett 等, (1984) *J. Virol.*, 49 :857-864 ;Panicali 等 (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79 :4927-4931)。

[0055] 为了有效翻译插入的海帕西啉蛋白或其片段的编码序列,可能还需要特殊的起始信号. 所述信号包括 ATG 起始密码子和相邻的序列. 在将包括它自身的起始密码子和相邻的序列在内的完整的海帕西啉蛋白基因组插入合适的表达载体的情况下,不再需要额外的翻译控制信号。不过,在只插入了一部分海帕西啉蛋白编码序列的情况下,必须提供包括 ATG 起始密码子在内的外源翻译控制信号. 另外,所述起始密码子必须与海帕西啉蛋白或其片段的编码序列的读框同相,以便确保整个插入片段的翻译. 所述外源翻译控制信号和起始密码子可以具有各种来源,都可以是天然和合成的. 通过包含合适的转录增强子元件,转录终止子等可以增强表达效率 (参见 Bitter 等, (1987) *Methods in Enzymol.*, 153 :516-544)。

[0056] 另外,可以选择宿主细胞系,它能调节插入序列的表述,或以所需的特定方式修饰并且加工所述基因产物. 在存在某些诱导物的情况下,可以加强由某些启动子驱动的表达 (例如,对于金属硫蛋白启动子来说是锌和镉离子)。因此,可以控制遗传工程改造过的海帕西啉蛋白或其片段的表达。如果克隆的外源基因的蛋白产物对宿主细胞来说是致死的话,这样做是重要的。另外,蛋白产物的修饰 (例如,糖基化) 和加工 (例如,切割) 对于该蛋白的功能来说可能是重要的。不同的宿主细胞具有用于蛋白翻译后加工和修饰的特征性的和特异性的机制. 可以选择合适的细胞系和宿主系统,以便确保所表达的外源蛋白的正确的修饰和加工。

[0057] 包括海帕西啉蛋白或其片段的编码序列并且能表达生物学活性的海帕西啉蛋白或其片段的基因产物的宿主细胞可以通过至少四种普通方法鉴定:(a) DNA-DNA 杂交;

(b) “标记”基因功能的存在或不存在；(c) 评估转录水平，如通过海帕西啉蛋白 mRNA 转录物在宿主细胞中的表达所测量的；和 (d) 检测海帕西啉蛋白基因产物，如通过免疫测定和通过它的生物学活性所测量的。

[0058] 在上述第一种方法中，可以通过 DNA-DNA 杂交检测插入所述表达载体的海帕西啉蛋白或其片段的编码序列的存在，其中使用包括与海帕西啉蛋白的编码序列或其特定部分同源的核苷酸序列的探针，基本上如最近所描述的 (Pigeon 等, (2001) J. Biol. Chem. 276, 7811-7819)。

[0059] 在第二种方法中，可以根据特定“标记”基因功能（例如，胸苷激酶活性，对抗生素的抗性，对氨甲蝶呤的抗性，转化表型，包含体在杆状病毒中的形成等）的存在或不存在来鉴定并且选择重组表达载体 / 宿主系统。例如，如果海帕西啉蛋白或其片段的编码序列被插入载体的标记基因序列上，可以通过所述标记基因功能的不存在来鉴定包括海帕西啉蛋白或其片段的编码序列的重组体。另外，标记基因可以与海帕西啉蛋白或其片段的编码序列串联，其处于用于控制海帕西啉的编码序列表达的相同或不同启动子的控制之下。所述标记针对诱导或选择的表达表明了海帕西啉蛋白的编码序列的表达。

[0060] 在第三种方法中，可以通过杂交测定评估海帕西啉蛋白或其片段的编码区的转录活性。例如，可以分离 RNA，并且通过 RNA 印迹进行分析，其中使用与海帕西啉蛋白或其片段的编码序列或其特定部分同源的探针，基本上如文献中所描述的 (Pigeon 等, (2001) J. Biol. Chem. 276, 7811-7819)。另外，可以提取宿主细胞的总的核酸，并且测定其与所述探针的杂交。

[0061] 在第四种方法中，可以通过免疫学方法评估海帕西啉蛋白或其片段产物的表达，例如，通过蛋白印迹，免疫测定，如放射免疫沉淀和酶联免疫测定等。

[0062] 一旦鉴定了能表达海帕西啉蛋白或其片段的重组体，就应当分析所述基因产物。这可以通过基于所述产物的物理学，免疫学或功能特性的测定来实现。例如，本发明的方法包括用于生产海帕西啉蛋白的方法，其中，在能够表达所编码的海帕西啉蛋白的条件下培养含有合适的表达载体的宿主细胞，所述载体包括本发明的海帕西啉多肽。可以从所述培养物中回收海帕西啉蛋白，方便地为从培养基中回收，或者从用所述宿主细胞制备的裂解液中回收，并且进一步纯化。优选的实施方式包括这样的实施方式：其中，通过所述方法生产的蛋白是全长或成熟形式的蛋白。

[0063] 本发明还提供了由本发明的核酸片段或由本发明的核酸片段的简并变体编码的分离的海帕西啉蛋白。“简并变体”表示核苷酸序列与本发明的核酸片段（例如，ORF）不同的核苷酸片段，不过，由于遗传密码的简并性，它能编码相同的蛋白序列。本发明的优选核酸片段是能编码蛋白的 Orbs。

[0064] 还可以从业已改变成能表达海帕西啉蛋白的细胞中纯化本发明的海帕西啉蛋白。在本文中，当通过遗传操作使细胞能生产海帕西啉蛋白时，该细胞就被改变成能表达需要的多肽或蛋白，所述细胞正常情况下不能产生所述蛋白或者所述细胞正常情况下只能以较低水平产生所述蛋白。本领域技术人员可以方便地改进方法，以便将重组或合成序列导入真核或原核细胞并且表达重组或合成序列，以便生成能产生本发明的海帕西啉蛋白的细胞。

[0065] 本发明的海帕西啉蛋白还可以作为转基因动物的产物表达，例如，作为转基因母

牛,山羊,猪或绵羊的乳成分,这些动物以包括编码海帕西啉蛋白的核苷酸序列的体细胞或生殖细胞为特征。

[0066] 海帕西啉蛋白还可以通过已知的常规化学合成生产。通过合成方法构建本发明的海帕西啉蛋白的方法为本领域技术人员所熟知。所述合成构建的海帕西啉蛋白序列,由于共有天然海帕西啉蛋白的一级,二级或三级结构或构象特征,所以可能具有共同的生物学特性,包括蛋白活性。因此,可将其用作天然的,纯化的海帕西啉蛋白的生物学活性或免疫学替代物,用于筛选治疗性化合物,并且用于开发抗体的免疫学方法中。

[0067] 本发明的海帕西啉蛋白可以通过在适合表达所述重组蛋白的培养条件下培养转化过的宿主细胞来制备。然后可以利用已知的纯化方法从所述培养物(即从培养基或细胞提取物中)中纯化所得到的表达的海帕西啉蛋白,所述方法如凝胶过滤和离子交换层析。海帕西啉蛋白的纯化还可以包括装有能结合所述蛋白的试剂的亲合柱;在所述亲和树脂上的一个或多个柱步骤,如伴刀豆球蛋白A-琼脂糖,肝素-toyopearl™或Cibacrom blue 3GA Sepharose™;涉及疏水相互作用层析的一个或多个步骤,其中使用诸如二苯醚,丁基醚或丙基醚的树脂;或免疫亲和层析。

[0068] 另外,本发明的海帕西啉蛋白还能够以便于纯化的形式表达。例如,它可以作为融合蛋白表达,如麦芽糖结合蛋白(MBP),谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或硫氧还蛋白(TRX)的融合蛋白,或作为His标记。用于表达和纯化所述融合蛋白的试剂盒可以通过商业渠道分别从NewEngland BioLab(Beverly, Mass.), Pharmacia(Piscataway, N. J.)和Invitrogen购买。还可以用表位标记海帕西啉蛋白,并且随后通过使用针对所述表位的特异性抗体进行纯化。一种这样的表位(“**FLAG®**”)可以从Kodak公司(New Haven, Conn.)购买。

[0069] 预计保留了完整的或部分蛋白活性(例如,与TfR2受体结合,与海帕西啉特异性抗体结合等)并且可用于筛选或其他免疫学方法的海帕西啉蛋白/肽序列的其他片段和衍生物还可以根据本发明由本领域技术人员容易地制备。本发明包括这样的修饰。

[0070] 无论它是由于完整的基因序列,所述基因序列的一部分的表达所产生的,还是由于为了生产嵌合蛋白而连接在一起的两个或两个以上的基因序列而产生的,海帕西啉蛋白或其片段都应当是免疫反应性的。该免疫反应性可以通过标准免疫学技术证实,如放射免疫沉淀,放射免疫竞争或免疫印迹。

[0071] 能确定海帕西啉蛋白或其片段的抗体的生成

[0072] 可以将本领域所公知的各种方法用于生产针对海帕西啉蛋白的中间部分(20-50位氨基酸)或C-末端表位(65-84位氨基酸)的抗体。海帕西啉特异性抗体能结合这样的表位,而不结合其他已知的序列。所述抗体包括,但不局限于多克隆抗体,单克隆抗体,嵌合抗体,单链抗体,Fab片段以及Fab表达文库。为了生产抗体,可以通过用特定的海帕西啉蛋白,或合成的海帕西啉蛋白注射来对各种宿主动物进行免疫,所述动物包括,但不局限于兔,小鼠,大鼠等。可以将各种佐剂用于根据宿主物种增强免疫学反应,包括,但不局限于弗氏(完全和不完全)佐剂,矿物凝胶,如氢氧化铝,表面活性物质,如溶血卵磷脂,pluronic多元醇,聚阴离子,肽,油性乳剂,匙孔血蓝蛋白,二硝基苯酚,和潜在有用的人佐剂,如BCG(卡介苗)和小棒杆菌(*Corynebacterium parvm*)。

[0073] 本领域普通技术人员可以用多种温血动物容易地制备多克隆抗体,如马,牛,各种

家禽,兔,小鼠或大鼠。简单地讲,将海帕西啉蛋白用于通过腹膜内,肌内,眼内或皮下注射对所述动物进行免疫,同时使用诸如弗氏完全或不完全佐剂的佐剂。在经过若干次加强免疫之后,收集血清样品,并且检测与海帕西啉的反应性。特别优选的多克隆抗血清能够在所述测定之一上产生信号,该信号至少比背景强三倍。一旦所述动物的效价达到了对海帕西啉的反应性的平台期,就可以通过每周放血,或通过给所述动物放血方便地获得较大量的抗血清。

[0074] 抗海帕西啉的肽的单克隆抗体可以通过使用任何技术制备,这些技术可以通过培养物中的连续的细胞系生产抗体分子。所述技术包括,但不局限于最初由 Kohler 和 Milstein 描述的杂交瘤技术 (Nature, (1975) 256 :495-497),更近一些的人 B- 细胞杂交瘤技术 (Kosbor 等, (1983) Immunology Today, 4 :72),以及 EBV- 杂交瘤技术 (Cole 等, (1985) Monoclonal Antibody and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)。在本发明的其他实施方案中,对海帕西啉蛋白 / 肽特异性的单克隆抗体可以利用最新的技术在无菌动物体内生产 (PCT/US90/02545)。根据本发明,可以使用人抗体,并且可以通过使用人杂交瘤获得人抗体 (Cote 等, (1983) Proc. Natl. Acad. Sci., 80 :2026-2030) 或通过用 EBV 病毒体外转化人 B 细胞获得人抗体 (Cole 等, (1985) in, Monoclonal Antibody and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77-96)。实际上,根据本发明,可以使用为了生产“嵌合抗体”而开发的技术 (Morrison 等, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci., 81 :6851-6855 ;Neuberger 等, (1984) Nature, 312 :604-608 ;Takeda 等, (1985) Nature, 314 :452-454),所述技术将来自具有合适的抗原特异性的小鼠抗体分子的基因与来自具有合适的生物学活性的人抗体分子的基因剪接在一起;这样的抗体应当属于本发明。

[0075] 根据本发明,可以对所描述的用于生产单链抗体的技术 (美国专利号 4, 946, 778) 进行修改,以便生产海帕西啉蛋白特异性单链抗体。

[0076] 本发明的另一种实施方案采用了所描述的用于构建 Fab 表达文库的技术 (Huse 等, (1989) Science, 246 :1275-1281),以便能快速并且容易地鉴定具有对海帕西啉蛋白 / 肽的理想的特异性的单克隆 Fab 片段。

[0077] 包括对海帕西啉蛋白的特异性结合位点的抗体片段可以通过已知技术生成。例如,所述片段包括,但不局限于 :F(ab')₂ 片段,它可以通过用胃蛋白酶消化所述抗体分子生产,以及可以通过还原 F(ab')₂ 片段的二硫键产生的 Fab 片段。

[0078] 诊断测定和试剂盒

[0079] 本发明的另一种目的是提供用于诊断测定的试剂,以用于检测来自患有血色素沉着病,缺铁性贫血,含铁血黄素沉着症,肝硬化和本文所描述的其他此类疾病的个体的海帕西啉蛋白。

[0080] 在本实施方案的一种模式中,本发明的海帕西啉蛋白可以用作免疫测定的抗原,以用于检测患有血色素沉着病,缺铁性贫血,含铁血黄素沉着症,肝硬化和本文所描述的其他此类疾病的个体。本发明的海帕西啉蛋白,多肽和 / 或肽可用于本领域已知的任何免疫测定系统中,包括,但不局限于 :放射性免疫测定,酶联免疫吸附测定,“夹心”测定,沉淀素反应,凝胶扩散免疫扩散测定,聚集测定,荧光免疫测定, A 蛋白免疫测定和免疫电泳测定等。美国专利号 4, 629, 783 和它里面所引用的专利也描述了合适的测定方法。

[0081] 根据本发明,针对各种形式的海帕西啉蛋白生产的单克隆抗体或多克隆抗体可用

于血液, 脊髓液或其他体液的样品的免疫测定, 以便诊断患有血色素沉着病, 缺铁性贫血, 含铁血黄素沉着症, 肝硬化和本文所描述的其他疾病的受试者。

[0082] 在本发明的一种实施方案中, 通过静脉切开放血术从患者体内取出血液样品, 并且使该样品与诸如 EDTA 的抗凝剂接触, 混合, 以 600g 的速度离心 10 分钟, 并且排出血浆, 正如本领域所公知的, 或者通过腰椎穿刺从患者体内取出脊髓液样品。

[0083] 本文所描述的抗体可以用作多种不同免疫测定的基础试剂, 以便测定海帕西啶蛋白在组织, 血液或体液样品中的存在。一般来说, 所述抗体可用于任何类型的免疫测定, 无论是定性还是定量测定。其中包括非竞争型的双位点 (two-site) 夹心测定和单位点 (single site) 免疫测定, 以及传统的竞争性结合测定。

[0084] 为了便于检测, 以及它的定量性质, 特别优选的是夹心或双抗体测定, 其中存在多种变化形式, 所有形式都被认为包括在本发明的范围内。

[0085] 例如, 在标准的正向夹心测定中, 将未标记过的抗体固定在固体基质上, 例如, 微量滴定板孔, 并且使要检测的样品与所述结合的分子接触。在温育合适的时间段之后, 这段时间足以形成抗体-抗原二元复合物, 然后添加用能够诱导可检测信号的受体分子标记过的第二抗体, 并且继续温育足够时间, 以便与位于不同位点的抗原结合, 并且形成抗体-抗原-标记的抗体的三元复合物。将未反应的材料洗掉, 并且通过观察信号确定所述抗原的存在, 可以通过与含有已知量的抗原的对照样品比较来对所述信号进行定量。正向夹心测定的变化形式包括同时测定, 其中, 将样品和抗体同时添加到所述结合的抗体中, 或包括反向夹心测定, 其中, 首先组合标记过的抗体和要检测的样品, 温育, 并且添加到未标记过的表面结合抗体上。这些技术为本领域技术人员所熟知, 并且进行小的改变的可能性是显而易见的。在本文中, “夹心测定” 意在包括基于所述基本的双位点技术的所有变化形式。

[0086] 对于本发明的夹心测定来说, 唯一的限制因素是两种抗体对海帕西啶蛋白具有不同的结合特异性。因此, 多种可能的组合是可行的。

[0087] 作为更具体的例子, 在标准的正向夹心测定中, 第一抗体与固体支持物共价或被动结合。所述固体表面通常是玻璃或聚合物, 最常用的聚合物是纤维素, 聚丙烯酰胺, 尼龙, 聚苯乙烯, 聚氯乙烯或聚丙烯。所述固体支持物可以是管, 珠, 盘或小平板形式的, 或其他任何适合进行免疫测定的表面。所述结合方法为本领域所熟知。在结合之后, 在测试样品的制剂中洗涤固相-抗体复合物。然后将一等分试样含有要检测的海帕西啶蛋白的体液添加到所述固相基质中, 并且在 25°C 下温育一段时间, 所述时间段足以让所存在的任何海帕西啶蛋白与对海帕西啶蛋白特异性的抗体结合。然后将第二抗体添加到所述固相复合物上, 并且在 25°C 下再温育一段时间, 这段时间足以让所述第二抗体结合在所述第一抗体-抗原固相复合物上。所述第二抗体与报道分子连接, 它的可视信号被用于指示第二抗体与样品中任何抗原的结合。本说明书中所说的“报道分子”表示这样的分子, 由于它的化学性质, 所述分子可提供可以分析检测的信号, 这使得能够检测抗原-结合的抗体。检测必须至少是相对可定量的, 以便能够测定所述样品中抗原的量, 该量可以绝对量形式计算, 或者可以通过与含有已知正常水平的抗原的标准物 (或一系列标准物) 比较来进行。

[0088] 在这种类型的测定中最常用的报道分子是酶或荧光团。对于酶免疫测定来说, 酶与所述第二抗体缀合, 通常是通过戊二醛或高碘酸盐缀合。不过, 很好理解的是, 存在多种不同的缀合技术, 这些技术为本领域技术人员所熟知。常用的酶包括辣根过氧化物酶, 葡萄糖

氧化酶, β -半乳糖苷酶和碱性磷酸酶等。与所述特定酶一起使用的底物通常是经过选择的,以便在通过相应的酶水解时能产生可检测的颜色变化。例如,磷酸对硝基苯酯适用于碱性磷酸酶缀合物;对于过氧化物酶缀合物来说,通常使用 1,2-苯二胺或甲苯胺。还可能使用荧光底物,它能产生荧光产物,而不是使用上述显色底物。在所有场合下,将酶-标记过的抗体添加到第一种抗体-海帕西啶蛋白复合物中,并且让它与所述复合物结合,然后将多余的试剂洗掉。然后将含有所述合适底物的溶液添加到抗体-抗原-标记的抗体的三元复合物中。所述底物与和所述第二抗体连接的酶起反应,产生定性的可视信号,可以对该信号进一步地定量,通常通过分光光度测定法进行,以便提供对存在于所述血清样品中的抗原的量的评估。

[0089] 另外,可以将诸如荧光素或罗丹明的荧光化合物用化学方法偶联在抗体上,而又不改变它们的结合能力。在通过用特定波长的光线照射激活时,所述荧光染料-标记的抗体能吸收所述光能,诱导所述分子的激发性状态,然后发射出特有的较长波长的光线。所述发射似乎是可以光学显微镜可检测的特有颜色。对于酶免疫测定 (EIA) 来说,让荧光标记的抗体与所述第一种抗体-海帕西啶蛋白复合物结合。在洗涤未结合的试剂之后,让剩余的三元复合物暴露于具有合适波长的光线,并且观察到的荧光表示存在所述抗原。免疫荧光和 BIA 技术在本领域中都是十分完善的,并且对于本发明的方法来说是特别优选的。不过,还可以使用其他报道分子,如放射性同位素,化学发光或生物发光分子。技术人员容易理解如何改变所述方法,以便适应需要的用途。

[0090] 另外,所述要检测的样品是含有海帕西啶蛋白的人血液或脊髓液,可将其用于单位点免疫测定,其中,它共价或非共价附着在固体基质上。让未标记过的抗-海帕西啶蛋白抗体与结合在所述固体基质上的样品接触。在温育适当时间之后,该时间足以形成抗体-抗原二元复合物,然后添加用能够诱导可检测信号的报道分子标记过的第二抗体,并且继续温育足够的时间,以便形成抗原-抗体-标记过的抗体的三元复合物。对于单位点免疫测定来说,所述第二抗体可以是普通抗体(即针对免疫球蛋白的异种 (xenogeneic) 抗体,特别是与报道分子结合的抗-(IgM 和 IgG)),它能够结合对目标海帕西啶蛋白特异的抗体。

[0091] 可以将海帕西啶基因(突变的或正常的)用于铁代谢的测定中。所述基因是在来自人或动物受试者、健康受试者的细胞系或原代细胞,或来自其他生物(如啮齿类动物,昆虫,细菌,两栖动物等)的细胞中表达的,有或没有任何伴随的分子。例如,可通过使用放射性同位素测量所述细胞对铁的吸收。另外,还可以测量铁与海帕西啶基因产物的结合。所述实验有助于评估海帕西啶基因和海帕西啶基因产物在由细胞和细胞内对铁的吸收、结合和转运方面的作用。

[0092] 治疗性处理

[0093] 在本发明的一个方面,所述海帕西啶诊断方法和试剂盒可用于遗传学技术方法,如用于超表达或下调海帕西啶。在某些治疗用途中,需要下调海帕西啶基因,突变型海帕西啶基因,海帕西啶蛋白或突变型海帕西啶蛋白的表达和/或功能。例如,在体内铁积累不足的情况下,例如在某些贫血(即,地中海贫血,溶血性贫血,输血的情况下)中,需要下调正常海帕西啶基因或正常海帕西啶蛋白。另一方面,在铁在体内超量积累的情况下,需要下调突变型海帕西啶基因或海帕西啶蛋白。

[0094] 正如上文所讨论的,可以制备对正常或突变的海帕西啉蛋白特异的抗体。可以将所述抗体用于治疗本文所描述的疾病。例如,用于阻断突变型或正常海帕西啉基因的作用,如果与突变型蛋白相关的功能是对正常海帕西啉蛋白功能的上调并且导致铁在体内超量积累的话。类似的,可以将抗体治疗性地用于阻断导致铁在体内积累不足的海帕西啉蛋白的作用。

[0095] 通过类似方式,正常或突变形式的海帕西啉基因能够通过使用针对所述基因或它的转录物的反义寡核苷酸来下调。类似的策略可以按照上文所述与抗体结合使用。有关反义寡核苷酸的设计考虑和用途的特别有价值的综述,参见 Uhlmann 等,(1990) *Chemical Reviews* 90 :543-584,该文献的内容被收作本文参考。本发明的反义寡核苷酸可以通过任何公知的化学寡核苷酸合成方法合成。例如,所述方法一般描述于以下文献中:Winnacker *Chirurg*(1992) 63 :145。反义寡核苷酸最有利地是通过使用任何可通过商业渠道获得的自动化核酸合成仪制备的。一种这样的装置——Applied Biosystems 380B DNA 合成仪,采用了 β -氰乙基亚磷酰胺化学方法。

[0096] 由于互补于海帕西啉基因的 DNA 的完全核苷酸合成是已知的,所以所述 cDNA 序列的 mRNA 转录物也是已知的。因此,可以通过本领域技术人员所公知的寡核苷酸合成方法制备能够与所述转录物的任何部分杂交的反义寡核苷酸。尽管任何长度的寡核苷酸都可用于本发明中,但短于 12 个碱基的序列可能在与目标 mRNA 杂交时特异性较低,可能更容易被酶促消化破坏,并且可以通过酶促消化而去稳定化。因此,优选具有 12 个或更多个核苷酸的寡核苷酸。长的序列,特别是长度超过大约 40 个核苷酸的序列在抑制翻译方面可能不够有效,这是因为靶细胞对其的吸收降低。因此,优选具有 12-40 个核苷酸的寡聚体,更优选 15-30 个核苷酸,最优选 18-26 个核苷酸。具有 18-24 个核苷酸的序列是最特别优选的。

[0097] 在本发明的另一个方面,可以将海帕西啉用于治疗本文所描述的疾病,包括用海帕西啉,以及海帕西啉的激动剂或拮抗剂治疗受试者。通过改变海帕西啉的浓度和/或抑制海帕西啉与铁或与运铁蛋白受体结合,可以调节细胞对铁的吸收。因此,海帕西啉,以及海帕西啉的激动剂或拮抗剂可用于治疗存在铁代谢紊乱的状况。例如,所述物质可用于治疗以下状况,如血色素沉着病,神经变性病,缺血性组织损伤,包括缺血性中风或创伤,心脏病和肿瘤,特别是皮肤癌和本文所描述的其他此类疾病。

[0098] 本发明还预期用海帕西啉调节铁代谢的方法。具体地讲,本发明涉及用于治疗与铁代谢紊乱相关的状况的方法,包括施用铁调节量的海帕西啉,或海帕西啉的刺激剂,激动剂或拮抗剂。举例来说,可以用本发明的方法治疗的与铁代谢相关的状况包括血色素沉着病,神经变性病,缺血性组织损伤,包括缺血性中风或创伤,心脏病和肿瘤,特别是皮肤癌和本文所描述的其他此类疾病。作为海帕西啉的激动剂或拮抗剂的物质可以通过以下方法鉴定,即测定所述物质对海帕西啉和铁,或海帕西啉和运铁蛋白受体 TfR1 或 TfR2 的结合活性的影响,或所述物质对海帕西啉在能够表达海帕西啉的细胞中的表达的影响,所述细胞包括通过遗传工程改造成能在它们的表面上表达海帕西啉的细胞。

[0099] 因此,本发明的一个方面涉及鉴定海帕西啉的激动剂或拮抗剂的方法,包括让被怀疑是海帕西啉的激动剂或拮抗剂的物质与海帕西啉和铁在海帕西啉能够与铁结合的条件下起反应;测量与铁结合的海帕西啉的量;并且通过将铁结合的海帕西啉的量与用对照测定的量进行比较来测定所述物质的作用。本发明还涉及鉴定海帕西啉的激动剂或拮

抗剂的方法,包括让被怀疑是海帕西啉的激动剂或拮抗剂的物质与海帕西啉和运铁蛋白受体在海帕西啉能够与所述运铁蛋白受体结合的条件下起反应;测量与运铁蛋白受体结合的海帕西啉的量;并且通过将所述海帕西啉的量与用对照测定的量进行比较来测定所述物质的作用。

[0100] 本发明还涉及鉴定海帕西啉的激动剂或拮抗剂的方法,包括让被怀疑是海帕西啉的激动剂或拮抗剂的物质与能产生海帕西啉的细胞起反应,测量由所述细胞表达的海帕西啉的量,并且通过将海帕西啉的表达量与测定的对照的量进行比较来测定所述物质的作用。本发明还涉及用于鉴定由海帕西啉的激动剂或拮抗剂-介导的铁吸收的方法,包括:在存在铁和不存在运铁蛋白的情况下温育能在它表面上表达海帕西啉的细胞和被怀疑是海帕西啉的激动剂或拮抗剂的物质,测量吸收到所述细胞中的铁的量,并且通过将所述细胞的铁吸收量与在不存在所述底物的条件下来自对照温育的细胞中的铁吸收量进行比较来鉴定由海帕西啉的激动剂或拮抗剂介导的铁吸收。

[0101] 在本发明的某些实施方案中,提供了用于治疗具有主要为铁过量疾病或综合征的症状的受试者的海帕西啉肽,所述疾病或综合征如血色素沉着病或由于次要原因,如反复输血导致的其他铁过量状况。海帕西啉肽可以是全长的海帕西啉或海帕西啉的某些片段。海帕西啉肽优选包括海帕西啉的 28-47 或 70-80 位氨基酸残基。在以下文献中提供了海帕西啉的推测的氨基酸序列以及基因组和 cDNA 序列 (Krause 等, (2000) FEBS Lett. 480, 147-150; Pigeon 等, (2001) J. Biol. Chem. 276, 7811-7819), 所述文献被以它们的全文形式收作本文参考。海帕西啉蛋白或其片段可以与 β -2-微球蛋白一起施用,如以复合物形式施用。在某些实施方案中,超过大约 20 个氨基酸的海帕西啉蛋白是以与 β -2-微球蛋白的复合物形式施用的。

[0102] 在本发明的某些实施方案中,提供了海帕西啉蛋白或运铁蛋白受体的激动剂或拮抗剂。例如,海帕西啉多肽的激动剂和 / 或运铁蛋白受体的拮抗剂可用于治疗原发性或继发性铁过量疾病或综合征,而海帕西啉多肽的拮抗剂,或运铁蛋白受体的激动剂可用于治疗,例如,缺铁状况,如贫血。在其他实施方案中,提供了突变型海帕西啉蛋白 / 肽,它起着野生型海帕西啉蛋白的拮抗剂的作用。拮抗剂或激动剂还可以是针对运铁蛋白受体或海帕西啉蛋白的中间部分 (20-50 位氨基酸) 或 C-末端区 (65-84 位氨基酸) 的抗体。在本发明的某些实施方案中,海帕西啉多肽可以作为运铁蛋白受体的拮抗剂。在本发明的其他实施方案中,可以利用本领域所熟知的技术将肽模拟物 (peptidomimetic) 设计成海帕西啉蛋白和 / 或运铁蛋白受体的拮抗剂或激动剂。

[0103] 运铁蛋白受体的配体,无论是拮抗剂还是激动剂,都可利用本文所描述的技术筛选与运铁蛋白受体结合的能力。另外,与海帕西啉结合运铁蛋白受体的竞争可以用本领域所熟知的技术实现。使用本文所描述的技术,可以筛选海帕西啉蛋白的配体的,或更常见地它的结合配偶体的,例如,抑制海帕西啉蛋白多肽与 β -2 微球蛋白复合的能力。

[0104] 在本发明的某些实施方案中,运铁蛋白的激动剂或拮抗剂类似地被用于增加或降低转运到细胞中的铁的量,如转运到患者的肝细胞或淋巴细胞中。例如,药物效力,治疗剂,激动剂或拮抗剂可以通过筛选程序鉴定,其中,在体外细胞系统中监控调节作用。能表达各种突变型海帕西啉蛋白 / 肽的宿主细胞系统适合用作第一筛选系统。可以通过以下方法评估候选药物,即与所述细胞一起温育,并且测定依赖于海帕西啉基因的细胞功能或测

量正确的海帕西啉蛋白折叠或加工。所述测定还需要测量受体样活性,铁转运和代谢,基因转录或其他上游或下游生物学功能,正如通过研究海帕西啉基因功能所证实的。

[0105] 另外,可以使用无细胞系统。可以将纯化的海帕西啉蛋白重建成人工膜或小泡,并且在无细胞系统中进行药物筛选。所述系统通常更方便,并且本身更适合高通量的筛选和自动化。

[0106] 用于确定海帕西啉蛋白纯度的标准包括蛋白化学领域的标准。其中包括 N-末端氨基酸测定,单向和双向聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染色。纯化的蛋白适合用于与确定二级和三级结构相关的研究中,如辅助药物设计,并且用于所述分子的生物学功能的体外研究中。

[0107] 在本发明的某些实施方案中,可以根据对已知海帕西啉蛋白的结构和功能相关性的了解设计药物来调节海帕西啉基因和海帕西啉蛋白的活性。为此,通过利用 X-射线晶体学,计算机辅助的分子建模 (CAMM),定量或定性结构活性关系 (QSAR),和类似技术进行的合理的药物设计还可以集中在药物发现方面。合理化设计使得能够预测能与海帕西啉蛋白相互作用并且修饰海帕西啉蛋白活性的蛋白或合成结构。所述结构可以是在生物学系统中化学合成或表达的。该方法业已在以下文献中进行过综述:Capsey 等, *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs*, Stockton Press, New York (1988)。另外,可以设计,合成组合文库,并且用于筛选程序。

[0108] 为了施用基于或源于本发明的治疗剂,可以理解的是,可以将合适的载体,赋形剂和其他试剂掺入所述制剂中,以便提供改善了的转移,送递,耐受性等。

[0109] 在所有药理学化学家所普通公知的配方集中可以找到多种合适的制剂: Remington's *Pharmaceutical Sciences*, (15th Edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1975)), 特别是其中的第 87 章,作者 Blaug, Seymour. 例如,所述制剂包括粉末,糊剂,软膏,胶冻,蜡,油,脂类,无水吸收基质,水包油或油包水乳剂,乳剂聚乙二醇 (carbowax) (具有各种分子量的聚乙二醇),半固体凝胶和含有聚乙二醇的半固体混合物。

[0110] 上述任何制剂都可能适用于本发明的处理和/或治疗,前提是所述制剂中的活性剂不会被所述制剂灭活并且所述制剂是生理学上相容的。

[0111] 本发明并不局限于本文所描述的实施方案,并且可以在不超出本发明范围的前提下进行修饰或改变。

[0112] 实施例:

[0113] 实施例 1:海帕西啉在人肝脏中的表达。

[0114] 组织和组织制备

[0115] 用于本研究的人肝脏样品 (n = 7) 是在对患有肝脏转移的成年受试者进行半肝切除术之后获得的。健康组织在 4% 多聚甲醛中固定,以便用于免疫组织化学,或者马上在液氮中冷冻,以便用于 RT-PCR,蛋白印迹和免疫荧光分析。

[0116] 对豚鼠 (n = 7) 和小鼠 (n = 5) 进行麻醉,随后通过颈脱位法处死。切除来自肝脏,骨骼肌和心脏的组织样品,并且马上在液氮中冷冻,以便进行蛋白印迹分析或在多聚甲醛中固定。

[0117] 肽合成,免疫步骤和抗体。

[0118] 根据公开的海帕西啉原序列 (Krause 等, (2000) *FEBS Lett.* 480, 147-150; Pigeon

等, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 7811-7819), 采用标准 Fmoc 方法合成了作为 C 末端酰胺的肽海帕西啉-(28-47) 和海帕西啉-(70-84) (Cetin 等, (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2935-2939). 使用间马来酰亚胺基苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯将肽偶联在匙孔血蓝蛋白上, 并且用每一种肽缀合物 (Eurogentec, Seraing, 比利时) 对两只 SPF 兔 (Charles River IffaCredo) 进行免疫. 在通过 ELISA 检测效价之后, 将三种抗血清 [抗海帕西啉 (70-84) 的 EG(1)-HepC 以及各自抗海帕西啉 (28-47) 的和 EG(1)-HepN 和 EG(2)-HepN] 用于本研究 (图 1) (海帕西啉 28-47 : PQQ TGQ LAE LQP QDR AGA RA SEQ (SEQ ID NO : 3), 海帕西啉 70-84 : CGC CHR SKC GMC CKT (SEQ ID NO : 4)). 正如通过 BLAST P2 检索所证实的, 用于生成所述抗血清的肽表位与任何迄今为止所报道过的蛋白都没有同源性.

[0119] 抗小鼠 Tfr2 的 BT-TFR21S 抗体 (BioTrend, Cologne, 德国) 是针对小鼠 Tfr2- α (Tfr2) 的细胞质 N-末端产生的, 其可变剪接成 α 和 β 同种型, 参见 Fleming 等, (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2214-2219), 它与人 Tfr2- α 的相应的区域具有 68% 的序列同源性. 所述抗体是在兔体内产生的, 并且进行亲和纯化.

[0120] 在人肝脏中进行表达分析.

[0121] 用 Qiagen RNA easy 试剂盒进行 RNA 分离, 包括 DNA 消化. 按以前描述的方法进行逆转录 (RT)-PCR 分析 (Kulaksiz 等, (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 6796-6801; Kulaksiz 等, (2002) *Am. J. Pathol.* 161, 655-664), 使用沿 5' \rightarrow 3' 方向提供的以下引物和说明: 人海帕西啉 (GenBank 数据编号 .NM0211175), 5' -CTG CAACCC CAG GAC AGA G-3' (SEQ ID NO5) 和 5, GGA ATA AAT AAG GAAGGG AGG GG-3', (SEQ ID NO6), 相当于 147-165 和 338-316 号核苷酸位置. 人 Tfr2 (#AF067864), 5' -GAT TCA GGG TCA GGG AGG TG-3' (SEQ ID NO7) 和 5' -(GAA GGG GCT GTG ATT GAA GG-3' (SEQ ID NO8); 相当于 2496-2515 和 2694-2675 号核苷酸位置. 在 94°C 下进行 4 分钟的最初的变性之后, 对反应物进行 35 轮以下热程序: 94°C 进行 30 秒, 60°C 进行 30 秒和 72°C 进行 30 秒; 在该程序之后在 72°C 下进行最后 5 分钟的延伸步骤. 扩增产物在溴化乙锭-染色的 1.8% 的 89mM Tris/89mM 硼酸/2mMEDTA (pH8.3) 琼脂糖凝胶上电泳. 通过合适的对照排除了显著水平的基因组 DNA 的扩增.

[0122] 在 HepG2 细胞中进行表达分析

[0123] 人肝细胞瘤 HepG2 细胞是从德国微生物和细胞培养物保藏所 (German Collection of Microorganisms and Cell Culture) (Braunschweig, 德国) 获得的, 并且在 37°C 下, 在 5% CO₂ 中, 在 RPMI1640 培养基 (Gibco, Karlsruhe, 德国) 中生长, 该培养基补充了 10% (体积/体积) 热灭活的 FBS, 青霉素 (100 单位/ml) 和链霉素 (100mg/ml). 通过 RT PCR 分析细胞, 其中使用上面所提到的引物说明. 为了进行免疫荧光显微镜术, 让 HepG2 细胞在玻璃载玻片上生长, 在甲醇中固定 4 分钟, 并且通过在 PBS 中制备的 0.5% TritonX-100 进行透化. 在与海帕西啉 (1:2000) 和 Tfr2 抗体 (1:1000) 一起温育 60 分钟之后, 与 Cy-3-缀合的抗-兔抗体 (Dianova, Hamburg, 德国) 一起温育, 在 Olympus AX70 显微镜下, 使用合适的滤色片进行免疫染色研究.

[0124] 从血清, 组织和 HEPG2 细胞中提取海帕西啉和 Tfr2.

[0125] 申请人使用从患有慢性肾衰竭的患者体内收集的血清作为更大的海帕西啉来源. 为了提取海帕西啉, 用 0.01 N HCl 以 1:1 的比例稀释 20ml 的血清样品, 并且用浓

盐酸将 pH 调整到 3.0。将冷冻组织和 HepG2 细胞在 0.5M 乙酸中混合,并且按描述的方法煮沸 8 分钟 (Cetin 等 (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 2935-2939; Cetin 等 (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 5925-5929)。使用 Ultra-Turrax 匀浆器 (Janke & Kunkel, Staufen, 德国) 进行匀浆之后,在 4°C 下以 20,000X g 的速度对所述样品进行 20 分钟离心,并且通过 0.45- μ m 孔径大小的滤器对上清液进行过滤。为了富集蛋白,将血清样品,细胞和总的组织提取物加样到十八烷甲硅烷基 (C18) 的 Sep-Pak 柱体 (cartridge) (Waters, Massachusetts) 上。用 0.01M HCl 洗涤该柱,并且用 30% (体积/体积) 2-丙醇 / 30% (体积/体积) 甲醇 / 0.01M HCl 进行洗脱 (Cetin 等 (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 2935-2939)。对蛋白级分进行冷冻干燥,并且在 -80°C 下保存待用。为了进行 Tfr2 分析,在含有 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH7.4, 10% 甘油, 1% Triton X-100, 2mg/ml 亮抑酶肽, 2mg/ml 胃酶抑制剂和 1mM 苯基甲基磺酰氟的 Tris-HCl 缓冲液中对组织和细胞进行匀浆,并且在 4°C 下以 100,000g 的速度离心 30 分钟。

[0126] 免疫印迹分析。

[0127] 为了进行蛋白印迹分析,在 94°C 下,在样品缓冲液中温育蛋白提取物 7 分钟,该缓冲液含有 4% (重量/体积) SDS (Merck, Darmstadt, 德国), 50mM Tris-HCl (pH8.15), 1mM EDTA, 3.24mM 二硫苏糖醇 (Roth, Karlsruhe, 德国), 12.5% (重量/体积) 甘油 (Merck) 和 0.002% 溴酚蓝 (Merck)。为了检测海帕西啶,按照公开的方法使用 16.5% N-[2-羟-1,1-二羟甲基乙基]甘氨酸 (tricine)-SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (Cetin 等, (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2935-2939; Kulaksiz 等, (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 6796-6801; Kulaksiz 等, (2002) *Am. J. Pathol.* 161, 655-664; Cetin 等, (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5925-5929)。用 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行 Tfr2 免疫吸印。在电泳之后,通过半干印迹将蛋白转移到基于疏水性聚偏 1,1-二氟乙烯的膜 (Pall, Portsmouth, England) 上。所述膜与上述稀释比例的海帕西啶或 Tfr2 抗体温育过夜。在含有 10mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl 和 0.05% Tween20 的 Tris 缓冲的盐溶液中洗涤之后,在与碱性磷酸酶缀合的山羊抗-兔抗体 (稀释比例为 1:50,000; Sigma) 一起温育之后显现各自的免疫反应性蛋白,其中使用氮蓝四唑和 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸作色原 (Sigma)。在使相应的肽免疫原与所述抗体进行预温育之后,对蛋白印迹上的免疫反应进行了特异性阻断。通过合适的对照排除了与第二山羊抗-兔抗体的交叉反应性 (Cetin 等 (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 2935-2939; Kulaksiz 等 (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 6796-6801; Kulaksiz 等 (2002) *Am J Pathol* 161, 655-664; Cetin 等 (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 5925-5929)。

[0128] 免疫组织化学和免疫荧光。

[0129] 在 4°C 下在 4% 多聚甲醛中将组织固定 18 小时。在分级乙醇系列中脱水之后,将样品包埋在石蜡中。通过抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物 (ABC) 技术和前述温育序列对石蜡切片 (5 μ m) 进行海帕西啶 (抗体 EG(1)-HepN, EG(2)-HepN 和 EG(1)-HepC, 分别以 1:2000 的比例稀释) 或 Tfr2 (抗体 BT-TFR21-S, 以 1:1000 的比例稀释) 的免疫染色 (Kulaksiz 等, (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 6796-6801; Kulaksiz 等, (2002) *Am. J. Pathol.* 161, 655-664)。所述切片在 4°C 下与各自的抗体一起温育 24 小时,然后与生物素化的抗-兔 IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, 美国) 一起温育 30 分

钟, 稀释比例为 1 : 200. 所述切片随后用预先形成的生物素 - 过氧化物酶 / 链霉抗生物素蛋白的复合物 (JacksonImmunoResearch) 温育 30 分钟, 它是在 PBS 中稀释的 (终浓度为: 生物素 - 过氧化物酶, $0.7 \mu\text{g/ml}$; 链霉抗生物素蛋白, $5 \mu\text{g/ml}$). 通过在用 0.05M Tris-HCl pH7.6 制备的 0.07mM 二氨基联苯胺盐酸盐 / 0.002% H_2O_2 中温育所述切片, 来显现抗原 - 抗体结合位点.

[0130] 为了进行免疫荧光显微镜术, 用冷冻切片机 (cryotome) (FrigoCut2800E; Leica, Nussloch, 德国) 制备了来自人肝脏的组织切片 ($2-4 \mu\text{m}$), 风干 2 小时, 并且在冷丙酮 (-20°C) 中固定 10 分钟. 按以前描述的方法进行双重免疫荧光标记 (Rost 等, (1999) *Hepatology* 29, 814-821), 其中使用特异性海帕西啉抗体 (以 1 : 1000 的比例稀释) 和针对小管 P-糖蛋白 (Centocor, Malvern, PA) 的单克隆抗体 C219 (同前), 稀释比例 1 : 30. 在与各自的抗血清一起温育之后, 通过与 Cy2- (1 : 200) 和 Cy3- (1 : 600) 标记的针对小鼠和兔 IgG 的标记的抗体 (Dianova, Hamburg, 德国) 一起温育进行染色. 用装有数码相机 (color view12, 软件成像系统 SIS, Munster, 德国) 和分析软件 (SIS, Munster, 德国) 的 Olympus AX70 显微镜拍摄显微照片.

[0131] 特异性对照.

[0132] 通过按公开方法进行对照排除了依赖于方法的非特异性 (Cetin 等, (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2935-2939; Cetin 等, (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5925-5929). 通过利用同种和异种抗原性肽预吸收所述抗体检测抗体特异性 ($6.25-100 \mu\text{g/ml}$ 的抗血清) (Kulaksiz 等, (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 6796-6801; Kulaksiz 等, (2002) *Am. J. Pathol.* 161, 655-664). 用浓度低到 $6.25 \mu\text{g/ml}$ 的同种抗原进行的抗体预吸收能完全阻断肝脏组织和细胞中的免疫染色, 而用浓度最高为 $100 \mu\text{g/ml}$ 的异种抗原进行的抗体预吸收, 对免疫染色没有作用.

[0133] 海帕西啉 ELISA 竞争结合测定.

[0134] 血清样品是从 26 位健康个体 (13 位女性, 13 位男性, 年龄为 26-64 岁, 平均年龄为 43 岁), 从 35 位在 HFE 上具有纯合的 C282Y 突变的 HH 患者 (14 位女性, 21 位男性, 年龄为 23 岁 - 82 岁, 平均年龄为 54 岁) (进行 (15 位患者) 和不进行 (20 位患者) 放血疗法), 并且从患有肾功能不全进行长期血液透析的 59 位患者 (33 位女性, 26 位男性, 年龄为 26-96 岁, 平均年龄为 57 岁) 体内获得的. 在样品收集期间, 要注意患者没有感染. 患有肾功能不全的 19 位患者的组患有以血红蛋白最大值为 11g/dl 为特征的肾贫血. 所有患有慢性肾功能不全的患者每周用 $3,000\text{IE}$ 重组人促红细胞生成素 (EPO) 治疗 2-3 次. 将 10ml 血液样品抽入冰冷的血清试管中, 并且在 4°C 下以 $2500 \times g$ 的速度离心 10 分钟. 用 96 孔微量滴定板重复进行测定, 所述微量滴定板用 $200 \mu\text{l}$ / 孔的兔抗 - 海帕西啉抗体 EG (2) - HepN 进行涂覆, 所述抗体以 1 : 4000 的比例稀释在含有 40mM Tris-HCl (pH7.3), 100mM NaCl 的 Tris 缓冲的盐溶液 (TBS) 中. 将 $50 \mu\text{l}$ 含有各种量的合成肽 ($0, 20, 100, 500$ 和 1000ng/ml) 的标准物或人血清样品和 $150 \mu\text{l}$ N-末端生物素化的海帕西啉 - (28-47) (Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg, 德国) (2ng / 孔) 添加到每一个孔中, 并且在室温下温育 1 小时. 在用 TBST (含有 0.05% Tween20 的 TBS) 洗涤之后, 通过链霉抗生物素蛋白 - 过氧化物酶 (Dako, Hamburg, 德国) 检测生物素化的抗原 - 抗体复合物, 其中使用底物四甲联苯胺 (DRG Instruments GmbH, Marburg, 德国); 用 1M H_2SO_4 终止显色反应, 并且在 $450/630\text{nm}$ 的波长下

读出该溶液的消光值。

[0135] 将四个目标组测量的海帕西啉值输入 EXCEL 电子制表软件,并且用 SAS WIN Version8.2 进行评估。通过对诊断组进行以下概括统计归纳所述测量值:观察的数目,算术平均,标准差,最小值,中间值和最大值。通过成对的 Wilcoxon U- 检验分析各组之间可能的差异。将显著性水平 α 设定为 5% (0.05)。通过斯皮尔曼等级相关 (Spearmanrank correlation) 分析海帕西啉原和铁,铁蛋白或运铁蛋白之间的相关性。

[0136] 在肝脏和 HepG2 细胞中表达海帕西啉和 Tfr2。

[0137] RT-PCR 分析证实,海帕西啉是在人肝脏中表达的 (Gehrke 等 (2003)Blood MS#2002-11-3610.R2)。类似地,在 HepG2 细胞中检测到了 192-bp 的预期的 PCR 产物 (对照),业已证实它能表达海帕西啉 (Pigeon C 等 (2001)J Biol Chem276,7811-7819 ;Gehrke 等 (2003(图 2,A)。另外,RT-PCR 分析明确揭示了 Tfr2 是在人肝脏和 HepG2 细胞中表达的 (数据未显示)。

[0138] 蛋白印迹分析中,所有海帕西啉抗体 [EG(1)-HepN,EG(2)-HepN 和 EG(1)-HepC] 都一致地在人和豚鼠肝脏的提取物中鉴定到大约 10kDa 的免疫反应性带。这种肝脏肽与由海帕西啉抗体在 HepG2 细胞的匀浆物中识别的免疫反应性带共迁移 (图 2,B-D)。所有抗体还在用人和豚鼠肝脏提取物和 HepG2 细胞提取物加样的所有泳道中鉴定了大约 20kDa 的免疫反应性蛋白。对骨骼肌提取物 (对照) 进行的蛋白印迹分析证实了既没有 10kDa 的免疫反应性带也没有 20kDa 的免疫反应性带 (图 2,B-D)。用 Tfr2 抗体 BT-TFR21-S 进行的蛋白印迹分析导致了预期的小鼠肝脏提取物中大约 105kDa 蛋白的染色 (Fleming 等, (2000)Proc. Natl. Acad. Sci. USA97,2214-2219)。在人肝脏和 HepG2 细胞的提取物中,通过相同的抗体识别了大约 95kDa 的免疫反应性 Tfr2 和在较低程度上识别了大约 105kDa 的免疫反应性蛋白 (数据未显示)。在心脏中未检测到免疫反应性 (对照组织)。

[0139] 在 HepG2 细胞中进行的免疫荧光。

[0140] 使用表位特异性抗-海帕西啉抗体,通过免疫荧光分析研究了海帕西啉肽在 HepG2 细胞中的表达。所有抗体都能类似地鉴定 HepG2 细胞中的海帕西啉,导致了强免疫反应性 (图 3)。与海帕西啉的细胞定位吻合,Tfr2 抗体检测到了相同细胞中的 Tfr2 (数据未显示)。

[0141] 海帕西啉和 TFR2 的细胞和亚细胞定位。

[0142] 用各种区域特异性抗体进行的免疫组织化学研究,都一致地将海帕西啉定位于人肝脏的肝细胞中 (图 4)。肝巨噬细胞,内皮细胞,胆管和血管系统完全缺乏海帕西啉免疫反应性。相同的抗体还在豚鼠肝脏中检测到了强的海帕西啉-免疫反应性 (图 4)。肝小叶在海帕西啉免疫反应性方面是非均一的:在肝小叶内,海帕西啉免疫反应性细胞主要位于门管周区域,并且海帕西啉阳性细胞的频率从门管三联体向中央静脉连续降低 (图 5)。显然,在海帕西啉阳性细胞之间存在显著的细胞间差异:尽管大部分肝细胞对海帕西啉是呈强阳性的,但其他细胞只表现出微弱的染色或对海帕西啉完全没有反应 (图 5)。在亚细胞水平上,通过免疫组织化学证实海帕西啉免疫反应性局限于肝细胞的基底外侧 (= 窦状) 膜区域;在各个细胞的顶膜区域上没有发现免疫反应性 (图 2)。类似的,免疫荧光分析证实了在基底外侧膜区域对海帕西啉的强的免疫反应性;通过用抗小管 P-糖蛋白的 C219 抗体进行的双重染色发现在顶膜区域无免疫反应性 (Rost 等 (1999)Hepatology29,814-821) (数据

未显示)。

[0143] 与海帕西啉的定位相应,蛋白-特异性抗体BT-TFR21-S在人和小鼠肝脏中检测到了TfR2.在细胞水平上,TfR2存在于肝细胞的基底外侧膜上,它揭示了与免疫反应性强度相关的显著细胞间差别(数据未显示).还在肝小叶中观察到了不均一性,免疫反应性沿中央静脉到门管三联体增强.

[0144] 检测人血浆中的海帕西啉前肽。

[0145] 用所述特异性N-末端海帕西啉抗体EG(2)-HepN开发了高可再现性的和灵敏度的稳定的海帕西啉原ELISA测定(DRG Instruments GmbH, Marburg, 德国).如图6所示,ELISA发现了在4-400ng/ml范围内的最高的分辨率,在该范围内,确定了人血清中海帕西啉原的浓度定.作为特异性对照,用异种肽进行了在ELISA中的温育.在使用异种肽时没有观察到交叉反应性.

[0146] 通过蛋白印迹分析证实了海帕西啉原在血液中的存在.所有海帕西啉抗体都能鉴定人血清提取物中的分子量为大约10kDa的单个海帕西啉免疫反应性带,该带与肝脏组织和HepG2细胞提取物中的免疫反应性海帕西啉共迁移(图2, B-D).

[0147] ELISA特征.

[0148] 该测定的灵敏度为3.95ng/ml.与最低标准物(20ng/ml)之间不存在重叠.溶解在零标准物中的人海帕西啉原的系列稀释液与海帕西啉原ELISA的标准曲线平行分布,回收范围在90.6-111.6%之间.回收率表达为根据预期的浓度观察到的百分比,其值为91.8-105.7%.在该测定范围内检测的三种海帕西啉原的浓度下,证实了很好的精确度(总CV<10%).

[0149] 在遗传性血色素沉着病,慢性肾机能不全和肾贫血中海帕西啉原的水平.

[0150] 采用灵敏的海帕西啉ELISA,在26位志愿者的健康对照组中检测到了在51.6-153.4ng/ml血清范围内的海帕西啉原(平均值±SE;106.2±32.1ng/ml)(图7,表1).在患有HH的患者体内,海帕西啉原的浓度为12.1-153.9ng/ml血清(平均值±SE;70.2±38.1ng/ml).与对照受试者相比上述浓度明显较低(P<0.05)(图7,表1).在患有CRI的患者血清中海帕西啉原浓度在31.1-471.3ng/ml范围内变化(平均值±SE;1481±88.0ng/ml),并且与对照受试者(P<0.01)和HH受试者(P<0.001)相比,明显增加了.相反,与患有CRI的患者相比,在患有RA的血液透析患者体内的海帕西啉原显著降低了(115.0±53.1ng/ml;范围,20.5-252.4ng/ml)(P=0.05)(图7,表1).

[0151] 在我们的样品中(来自HH,CRI和RA的血清),没有发现海帕西啉原和铁,铁蛋白或运铁蛋白饱和之间的显著相关性(图8).对与零的差别的检测证实无显著性.

[0152] 表1:成对的U-检验的结果(P-值)

[0153]

	慢性肾机能不全	肾贫血	血色素沉着病
对照	0.0419	0.6131	<0.0005
慢性肾机能不全		0.23	<0001
肾贫血			0.002

[0154] 讨论

[0155] 用特定引物进行的RT-PCR分析显示海帕西啉是在HepG2细胞(对照)中高度表达的,这种细胞是充分分化的肝细胞癌细胞系(Aden等(1979)Nature282,615-616),它在很

多方面都表现出正常肝细胞的生理学。使用成功地应用于 HepG2 细胞中的合适的引物说明和组合, RT-PCR 研究证实了海帕西啉在人肝脏中的表达。三种能识别海帕西啉前体分子上的不同表位的不同的抗体 (图 1) 不仅在 HepG2 细胞中, 而且还在两个物种人和豚鼠的肝脏提取物中一致地通过蛋白印迹 分析鉴定了大约 10kDa 的免疫反应性肽。这种免疫反应性肽的表观分子量与根据 cDNA 序列推测的海帕西啉激素原的推测的分子量吻合 (Pigeon C 等 (2001) *J Biol Chem* 276, 7811-7819) (图 1)。有趣的是, 通过所有海帕西啉抗体在 HepG2 细胞以及人和豚鼠肝脏的提取物中都检测到大约 20kDa 的第二个免疫反应性带, 但是在对照组织中缺乏该带。这种免疫反应性蛋白可能反映了二聚体类型的海帕西啉。实际上, 在以前的研究中, 描述了海帕西啉 -25 而不是海帕西啉 -20 的聚集特性和形成多聚体的可能性 (Hunter 等 (2002) *J Biol Chem* 277, 37597-37603)。

[0156] 用区域 - 和分子结构域 - 特异性海帕西啉抗体进行的免疫细胞化学研究发现了在 HepG2 细胞中存在强的免疫反应性, 证实了海帕西啉在所述细胞中的表达, 正如通过分子生物学技术业已证实的 (Gehrke 等 (2003) *Blood MS#2002-11-3610. R2*)。用上述不同的海帕西啉抗体进行的免疫组织化学和免疫荧光研究显示, 在人和豚鼠肝脏中, 海帕西啉特异性地定位于主要位于门管三联体周围的肝细胞中。通过不仅存在于人和豚鼠肝脏而且还存在于 HepG2 细胞中的不同的区域 - 特异性抗体进行的一致性的染色, 表明了肝细胞是海帕西啉的来源。海帕西啉免疫反应性沿门管周区域到中央静脉减弱。在门管小叶中的这种带状分布可能具有功能重要性, 因为门管周肝细胞具有通向门静脉的第一个通道, 将富含铁的血从肠带走。特别是, 在海帕西啉阳性细胞之间存在海帕西啉免疫反应性强度方面的明显的细胞间差异, 它有可能反映了海帕西啉表达或分泌方面的细胞间差异。

[0157] 在亚细胞水平上, 海帕西啉集中在肝细胞的基底外侧膜区域。在顶膜区域不存在免疫反应性。海帕西啉在亚细胞水平上的不连续的分布模式可能推测海帕西啉通过基底外侧向肝窦状隙中定向释放。这种定向分泌途径通过在人血清中检测到海帕西啉激素原 (图 1) 得到了进一步的证实 (参见下文); 因此, 以上发现提供了肝细胞可能以内分泌形式通过海帕西啉原的分泌调节铁代谢的进一步的证据。

[0158] 为了分析 Tfr2 的表达和细胞分布, 以及各自的目标膜区域, 在细胞水平上进行了 RT-PCR, 蛋白印迹和免疫组织化学研究。正如在以前的研究中所证实的, RT-PCR 分析发现 Tfr2 是在人肝脏中高水平表达的 (Fleming 等, (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2214-2219)。这种蛋白的存在是通过蛋白印迹研究证实的, 使用了对人和小鼠 Tfr2 特异的 BT-TFR21-S 抗体。在小鼠肝脏提取物中检测到大约 105kDa 的免疫反应性蛋白; 这种免疫反应性的 Tfr2 的分子量略大于预期的 95kDa (Fleming 等, (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2214-2219), 并且可能体现了以前所描述的某些翻译后修饰 (Kawabata 等, (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 16618-16625)。不过, 在相同条件下, Tfr2- 抗体能鉴定预期的 95kDa 分子量的蛋白, 而对人肝脏提取物中的 105kDa 的蛋白具有较低的亲和力。人和小鼠肝脏的免疫印迹之间的所述差别, 可能是由于物种间差异造成的。

[0159] 免疫组织化学研究发现, Tfr2 位于人和小鼠肝脏的肝细胞中; 与海帕西啉的细胞分布吻合, 所述蛋白 - 特异性抗体只能将 Tfr2 定位在基底外侧膜上。Tfr2 的这种膜 - 特异性结合的类型特别表明了 Tfr2 的基底外侧激活, 它与铁代谢相关, 这通过结合双铁运铁蛋白, 并且介导运铁蛋白 - 结合的铁从血液到肝细胞中的吸收来实现 (Philpott, C. C. (2002)

Hepatology35,993-1001 ;Subramaniam等,(2002)Cell Biochem. Biophys. 36,235-239)。特别是,对于 TfR2 观察到了与海帕西啉类似的小叶带状分布,其中免疫反应性沿门管周区域到中央静脉减弱。

[0160] 由于在以前的研究中业已讨论了在细胞水平上海帕西啉和 TfR2 之间的相互作用 (Nicolas 等,(2001)Proc. Natl. Acad. Sci. USA98,8780-8785 ;Frazer 等,(2002)Gastroenterology123,835-844),分析了海帕西啉和 TfR2 在 HepG2 细胞中的共同存在,该细胞是一种充分分化的肝细胞癌细胞系 (Aden 等,(1979)Nature282,615-616),在很多方面表明了正常肝细胞的生理学。使用成功地应用于人的肝脏的合适的引物说明和组合进行的 RT-PCR 研究,鉴定了海帕西啉和 TfR2 在 HepG2 细胞中的表达。在翻译水平上,通过蛋白印迹研究证实了海帕西啉和 TfR2 在 HepG2 细胞中的存在,该研究得到了具有正确分子量的免疫反应性蛋白带,其与来自肝脏组织的相应的免疫反应性带共迁移。所述各个蛋白在 HepG2 细胞中的共定位得到了免疫细胞化学的特别的验证,该方法使用了相应的区域-和分子结构域-特异性抗体。所有抗体证实了在 HepG2 细胞中的海帕西啉标记,发现了这些细胞中的颗粒状免疫反应性模式,这种模式推测所述肽定位于小的分泌小泡中,这点业已通过电子显微镜术在肝细胞中得到证实 (Schwartz 等,(1985)EMBO J. 4,899-904)。TfR2 是通过免疫细胞化学方法定位于 HepG2 细胞上的,具有特殊的分布模式。

[0161] 根据在转录和翻译水平上现有的数据,海帕西啉和 TfR2 是在肝脏中共表达的,并且共定位于肝细胞的基底外侧膜区域中。除了 TfR2 和海帕西啉在细胞水平上的共同定位之外,还检测了这些分子在肝小叶内的类似的分布,其中免疫反应性集中在门管周区域,并且在朝向中央静脉的方向上具有减弱的染色。所述蛋白在共同的(基底外侧)膜区域中的协同表达以及它们类似的小叶带状分布,说明可能存在所述调节性肽激素海帕西啉和通过 TfR2 的运铁蛋白-结合的铁吸收之间的形态功能偶联。实际上,不同的数据证实海帕西啉和 TfR2 之间的相互作用。首先,运铁蛋白饱和的改变可能通过 TfR2 感测到,所述改变调节肝脏海帕西啉的表达 (Philpott, C. C. (2002)Hepatology35,993-1001)。其次,正如对人肝脏进行定量 RT-PCR 分析所证实的,TfR2 的肝脏表达明显与通过运铁蛋白饱和调节的海帕西啉表达相关 (S. G. Gehrke, H. Kulaksiz 等,未发表的数据)。第三,海帕西啉和 TfR2 共定位于共同的细胞膜区域,并且揭示了相同的小叶分布,其中在门管周区域具有强的免疫反应性,如果在该位点发生了消除 TfR2 (Fleming 等,(2002)Proc. Natl. Acad. Sci. USA99,10653-10658) 以及海帕西啉 (Nicolas 等,(2001)Proc. Natl. Acad. Sci. USA98,8780-8785) 的表达,还有海帕西啉 (Zhou 等,(1998)Proc. Natl. Acad. Sci. USA95,2492-2497 ;Levy 等,(1999)Blood94,9-11) 和 B2m (Santos 等,(1996)J. Exp. Med. 184,1975-1985) 的表达的突变,就会发生肝脏铁过量。第四,据报道发生在 TfR2 基因中的突变导致了血色素沉着病 (Camasehella 等,(2000)Nat. Genet. 25,14-15);这可能是由于减弱了的海帕西啉表达所导致的,后者反过来又导致了铁吸收的增强 (Nicolas 等,(2001)Proc. Natl. Acad. Sci. USA98,8780-8785)。

[0162] 海帕西啉和 TfR2 在 HepG2 细胞中的同时存在,以及它们在肝脏中共同的极化定位和小叶分布可能表明了海帕西啉是固有的肝脏肽,在形态功能上与 TfR2 偶联,它是由运铁蛋白饱和调节的,并且反过来又调节海帕西啉表达。因此,预计根据对海帕西啉的信号传导途径的研究能得到相关发现。

[0163] 由于造血组织和铁储存位点,如肝脏,能向肠细胞传递表明身体对饮食铁的需求的信号 (Philpott C. C. (2002) *Hepatology*35, 993-1001),所以海帕西啉是从肝细胞中分泌出来的候选信号传导因子,并且调节肠的铁吸收. 不过,在本发明之前,对血液中存在某些分子形式的海帕西啉尚有争论 (Krause 等 (2000) *FEBS Lett*489, 147-150 ;Park 等 (2001) *J Biol Chem*276, 7806-7810 ;Hunter 等 (2002) *Biol Chem*277, 37597-37603).

[0164] 为了分析海帕西啉的激素原是否分泌到血液中,并且评估在健康志愿者和患有不同疾病的患者的人血清中的海帕西啉原水平的范围,通过采用针对海帕西啉激素原产生的 N- 末端抗体 EG(2)-HepN 开发了 ELISA. 尽管 C- 末端抗体 EG(1)-HepC 在斑点印迹,蛋白印迹,免疫组织化学和免疫荧光实验 (图 1-4) 中发现了特异性结果 (数据未显示),但是在 ELISA 中没有获得免疫反应性. 海帕西啉的紧凑的折叠模式以及它在血液中的三级结构,可能导致了 EG(1)-HepC 抗体不能鉴定循环中的海帕西啉.

[0165] 用抗体 BG(2)-HepN 进行的 ELISA 的特征是高再现性,稳定性和灵敏度,检测极限为 3.95ng/ 孔,以及在 4-400ng/ml 范围的高分辨率;在该范围中海帕西啉浓度可被确定. 在来自健康个体 (n = 26) 的人血清中,测得海帕西啉原在 51.6-153.4ng/ml 范围内 (平均值 \pm SE ;106.2 \pm 32.1ng/ml),这一结果与已知调节性肽激素的浓度一致,并且比人尿中海帕西啉的浓度高大约 11 倍 (Park 等 (2001) *J Biol Chem*276, 7806-7810). 有趣的是,表现出宽范围的海帕西啉原的测得的浓度表明所述肽可能受到了强的调节.

[0166] 所述 cDNA 结构提示,海帕西啉作为 84aa 的前肽原翻译,对它进行 N- 末端加工,形成 20-25 个氨基酸的肽 (Park 等 (2001) (图 1 和 9)). 尽管信号序列切割位点的强的共有序列位于 Gly²⁴ 和 Ser²⁵ 之间,这会产生 60 个残基的前肽,但以前的研究没有从诸如肝脏组织和血液的天然来源中分离到较大的前肽 (Park 等 (2001)). 除了技术上的难度之外,前肽转化酶 (convertase) 在肝脏中的大量存在,可能导致了某些前肽分离的抑制. 在这一方面,有两个研究小组进行的最新的研究业已表明,在血液 (Krause 等 (2000) *FEBS Lett*489, 147-150) 和在尿 (Park 等 (2001) *J Biol Chem*276, 7806-7810) 中的人循环形式的海帕西啉由所述蛋白的 C- 末端 20-25 个氨基酸组成. 不过,用针对海帕西啉前体的 N- 末端制备的特异性抗体进行的本发明的 ELISA 测定表明,除了 20-25 个氨基酸的加工形式之外,海帕西啉激素原是在人血液中分泌并且循环的. 实际上,通过蛋白印迹分析证实了海帕西啉原向血液中的潜在释放. 所有海帕西啉抗体在人血清的提取物中都鉴定了大约 10kDa 的单个海帕西啉带,它与肝脏和 HepG2 细胞的组织提取物中的免疫反应性海帕西啉 (阳性对照;图 1) 是共迁移的. 没有检测到小于 10kDa 的海帕西啉片段. 海帕西啉原在人血清中的存在,表明肝细胞能分泌海帕西啉的激素原,这能通过内分泌途径减弱饮食铁吸收.

[0167] 为了分析海帕西啉在患有铁过量患者体内的作用,本发明提供了在 HFE 中的 C282Y 突变纯合的 35 位 HH 患者血清中的海帕西啉浓度,在接受研究的所有 HH 患者中检测到典型的铁过量特征. 在这些个体内海帕西啉浓度没有如以前所推想的那样增加,以便减弱肠的铁吸收 (Fleming 和 Sly (2001) *Proc Natl Acad Sci USA*98, 8160-8162). 在 HH 患者血清中的海帕西啉原水平得到了意外的下调,这不仅发生在未治疗过的患者中,而且还发生在每周一次进行放血疗法的个体中. 与健康志愿者相比,海帕西啉原浓度显著降低,从 106.2 降低到 70.2ng/ml 血清. 在治疗过的和未治疗过的 HH 患者之间没有发现差异. 上述发现与以前的 HH 研究一致,表明了肝脏海帕西啉表达在 hfe 剔除小鼠 (Ahmad 等 (2002)

Blood Cells Mol Dis29,361-366 ;Muckenthaler 等 (2003)Nat Genet34,102-107) 和患有 HFE- 相关血色素沉着病的患者中明显减弱。它们还与体外研究吻合,证实原代人肝细胞和 HepG2 细胞的铁加载能下调海帕西啉 mRNA (Gehrke 等 (2003)BloodMS#2002-11-3610.R2 ;Nemeth 等 (2003)Blood101,2461-2463)。由于尽管铁过量,铁吸收在 HH 患者中也增强 (Pietrangelo A. (2002)Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol282,G403-414 ;Philpott C. C. (2002)Hepatology35,993-1001 ;Anderson 和 Powell (2002)Int J Hematol76,203-207), 并且组成型海帕西啉表达抑制了血色素沉着病的小鼠模型中的铁过量 (Nicolas 等 (2003)Nat Genet34,97-101), 所以推测海帕西啉调节作用在 HH 患者中受到破坏。海帕西啉的较低浓度明显不能充分抑制较高的肠的铁吸收。另外,根据肝脏海帕西啉表达在 hfe 剔除小鼠 (Ahmad 等 (2002)Blood Cells Mol Dis29,361-366 ;Muckenthaler 等 (2003)Nat Genet34,102-107) 以及在 HH 患者 (Bridle 等 (2003)Lancet361,669-673) 中的显著减弱的发现,尽管铁过量在 HH 患者中海帕西啉原上调仍然缺乏,表明了 HFE 可能参与了血清海帕西啉水平的调节。

[0168] 尽管以前的研究业已证实了尿的海帕西啉排泄与血清铁蛋白浓度密切相关 (Nemeth 等 (2003)Blood101,2461-2463), 但在本研究中,在 HH 或透析患者体内没有发现循环中的海帕西啉原和血清铁和铁蛋白水平之间的相关性,同样,没有检测到海帕西啉原和运铁蛋白饱和之间的相关性,有人认为这种饱和能调节肝脏海帕西啉的表达 (Gehrke 等 (2003)), 尽管接受研究的 HH 患者没有受到贫血,缺氧或炎症的影响,这体现了海帕西啉的影响参数。以上数据提示,通过铁储存调节血清中海帕西啉原的水平量,涉及到复杂的间接作用 (Nemeth 等 (2003)Blood101,2461-2463)。

[0169] 由于海帕西啉还可从尿中分离,所以本发明提供了对海帕西啉在肾机能不全患者体内的调节作用的评估。与 HH 患者和健康受试者不同,CRI 患者血清中的免疫反应性海帕西啉原的浓度显著提高,从健康受试者体内的 106.2ng/ml 提高到 148.1ng/ml。透析患者体内海帕西啉原水平的提高,提示肾脏可能参与了这种循环肽的代谢和 / 或消除。不过,目前尚不清楚尿中的海帕西啉仅仅是从血液中过滤的还是从肾脏中产生的。根据本发明,不能排除海帕西啉至少部分是从肾脏中释放的可能性,因为它还出现在肾脏小管细胞中 (Kulaksiz 等 (2003) 数据未发表)。

[0170] 本发明提供了对患有 RA 的透析患者的海帕西啉原血清水平的测定,这种病是人们公认的渐进性肾衰竭的并发症,它以常色的正常红细胞为特征。与健康受试者相比,在患有 RA 患者体内的免疫反应性海帕西啉原浓度没有明显更高 (平均 115.0ng/ml)。尽管在这些患者的末期肾机能不全导致了所述肽激素的积累,但是海帕西啉原水平明显低于没有贫血的透析患者的水平 (平均 148.1ng/ml)。根据本发明得出的结论是,海帕西啉在 RA 中的调节作用不同于在炎症或肝腺瘤的贫血中的调节作用。海帕西啉原在 RA 中的下调作用,反映了所述肽的反应性生理学调节作用,以便增强肠的铁吸收和铁从网状内皮巨噬细胞中的释放。本发明提出,尽管进行了 EPO 治疗,在患有 CRI 而没有贫血的患者组中海帕西啉原增加了。因此,得出的结论是由于血液减少,在 RA 中的海帕西啉减少,这可能是海帕西啉下调的原因 (Nicolas 等 (2002)J Clin Invest110,1037-1044)。

[0171] 本发明提供了用于测量人血清中海帕西啉原水平的 ELISA。该测定方法是非侵入性的,并且便于实施,因此适合常规操作。进行海帕西啉原测定,是因为它的精确度,灵敏

度,可再现性,以及对人血清样品的海帕西啉-(28-47)的准确测定.采用本发明的ELISA,使得第一次能够检测并且确定患有几种铁代谢疾病的患者体内的海帕西啉原.需要其他研究以便鉴定海帕西啉原在各种铁状态中的作用的确切分子机制.本发明还提出海帕西啉激动剂和拮抗剂应当是预防和治疗铁紊乱的潜在药物.

[0172] 为了理解海帕西啉的作用,对这种肽的细胞起源和信号传导途径的了解是必要的.在这一方面,本发明描述了在人和豚鼠肝脏中的海帕西啉免疫反应性,其中,它定位于肝细胞的基底外侧区域中.以前的研究业已推测了这些细胞和吸收性肠细胞(enterocyte)之间的可能的联系(Hunter等,(2002)J. Biol. Chem., M205305200;Anderson等,(2002)Biochem. Soc. Trans. 30,724-726).本发明描述了海帕西啉原在人血浆中的检测,因此表明了肝细胞分泌海帕西啉激素原,这有可能通过内分泌途径减弱饮食铁的吸收.另外,在HepG2细胞中检测到海帕西啉,其中,还发现了新发现的2型运铁蛋白受体(数据未显示).

[0173] 用于对人或动物血清和其他体液中的海帕西啉进行定量测量的酶免疫测定.

[0174] 在本发明的一种实施方案中,采用了海帕西啉酶免疫测定("EIA").EIA是基于竞争原理的固相酶联免疫吸附测定(ELISA).用抗海帕西啉-(28-47)的多克隆兔抗-海帕西啉抗体对96孔微量滴定板的微量滴定孔进行涂覆.存在于所述样品中的未知量的海帕西啉原与固定量的与生物素分子缀合的海帕西啉-(28-47)竞争固定在所述孔上的海帕西啉抗体的结合位点.在温育一个小时之后,洗涤所述微量滴定板,以便终止所述竞争反应.在随后的温育中,用链霉抗生物素蛋白辣根过氧化物酶检测结合的生物素分子.在温育半小时之后,再次洗涤所述平板.加入底物溶液,海帕西啉的浓度与测得的光密度成反比.

[0175] 材料:

[0176] 微量滴定孔:用抗-海帕西啉抗体涂覆的孔(96孔);试剂:生物素缀合物(与生物素缀合的海帕西啉)7ml;参考标准物组,各1.0ml;0,20,100,500,1000,2000ng/ml;海帕西啉原对照,低和高,2小瓶(冷冻干燥物);试剂:酶复合物(与辣根过氧化物酶("HRP")缀合的链霉抗生物素蛋白)14ml;试剂:底物溶液-HS-TMB,14ml;终止溶液,0.5M₂SO₄,14ml;洗涤溶液,40X,30ml;微量滴定板读出器(450±10nm)(例如,DRG Instruments MicrotiterplateReader);具有50和100μl的一次性管尖的精确微量移液管;标准电冰箱;吸水纸;去离子水.

[0177] 尽管业已根据优选材料对本实施方案进行了说明,但本发明领域的技术人员可以理解的是,可以将其他材料用于本发明.例如,本领域技术人员能够理解可以将除了生物素/链霉抗生物素蛋白之外的互补性结合部分,以及除了辣根过氧化物酶/过氧化物以外的酶/底物组合用于本发明.

[0178] 保存条件.

[0179] 当在2-8℃下保存时,完整的试剂在有效期都能保持反应性.不要使用超过有效期的试剂.微量滴定孔必须在2-8℃下保存.一旦箔袋破裂,就必须小心地再次将它严密地封闭.在破裂的,但是严密封闭的装有干燥剂的塑料拉链小袋中的状态下,所述涂覆的微量滴定孔的免疫反应性能稳定大约6周时间.

[0180] 样品收集和制备.

[0181] 应当将人或动物血清或EDTA血浆用于本测定.没有必要对所述生物学样品进行特殊预处理.所述样品可以在2-8℃下保存长达24小时,并且可以在-20℃或更低温度下

冷冻以保存更长时间。不要使用总体上发生溶血的或总体上脂血的 (lipemic) 样品。对于其他样品材料来说,可能必须采用特殊的提取方法。

[0182] 所述测定的性能:一般说明:

[0183] 所有试剂和样品在使用之前必须能够回温到室温。所有试剂必须在不起泡的情况下混合。

[0184] 一旦开始测定,所有步骤必须不间断地完成。

[0185] 将新的一次性塑料移液管管尖用于每一种试剂,标准物或样品,以便避免交叉污染。为了分配所述底物溶液和终止溶液,避免使用具有金属部分的移液管。

[0186] 将标准物和样品吸到所述孔的底部。为了转移酶缀合物和终止溶液,推荐将移液管保持所述孔上方的垂直位置,并且将相应的溶液分配到所述孔的中央,以便使酶缀合物与样品或标准物完全混合,并且使终止溶液与底物溶液完全混合。

[0187] 在开始测定之前,建议准备好所有试剂,去掉盖子,将所有需要的孔固定在固定器上等。这样能确保每一个移液步骤具有相同的所用时间而又没有中断。

[0188] 作为一般原则,酶促反应与时间和温度成线性比例。这样使得插值法可能适用于固定的物理化学条件。如果在测定中零标准物的吸光度低于 1.0 或高于微量滴定板分光光度计的性能上限,就可以将最终的颜色酶促形成的温育时间相应地延长或缩短到 30 或 10 分钟。由于在每一个处理中测定了校准器,所以吸光度变化不会影响结果。

[0189] 所述底物溶液应当是无色的或浅蓝色或浅绿色的。如果所述溶液是深蓝色的,所述试剂就是不稳定的,并且必须弃掉。

[0190] 在与底物溶液温育期间,避免阳光直接照射在微量滴定板上。

[0191] 试剂制备。

[0192] 参考标准物 and 对照:用 1.0ml 双蒸水 (bidistilled water) 重建冷冻干燥的标准物 / 对照小瓶的内含物。注意:重建的标准物 / 对照在 2-8°C 下能稳定 6 天时间。为了更长时间的保存,在 -20°C 下冷冻。洗涤溶液:将去离子水添加到 40x 浓度的洗涤溶液 (含量: 30ml) 中,达到 1200ml 的终体积。稀释过的洗涤溶液在室温下能稳定 2 周时间。

[0193] 测定步骤。

[0194] 将需要数目的涂覆的条固定在固定器上。

[0195] 将 50 μ l 海帕西啶标准物分配到合适的孔中。

[0196] 将 50 μ l 样品分配到选择的孔中。

[0197] 将 50 μ l 生物素缀合物分配到每一个孔中。

[0198] 充分混合所述平板 10 秒钟。重要的是确保在该步骤中的完全混合。

[0199] 在室温下温育 60 分钟。

[0200] 用力抖出所述孔的内含物。

[0201] 用稀释洗涤溶液 (400 μ l / 孔) 漂洗所述孔 3 次。让所述孔猛烈撞击吸水纸,以便排除残余的液滴。

[0202] 将 100 μ l 链霉抗生物素蛋白 HRP 复合物添加到所有孔中。

[0203] 在室温下温育 30 分钟。

[0204] 用力抖出所述孔的内含物。

[0205] 用稀释洗涤溶液 (400 μ l / 孔) 漂洗所述孔 3 次。让所述孔猛烈撞击吸水纸,以便

排除残余的液滴。

[0206] 以定时的间隔将 100 μ l 的底物溶液添加到每一个孔中。

[0207] 在室温下温育 15 分钟。

[0208] 通过向每一个孔中添加 100 μ l 的终止溶液终止酶促反应,时间间隔与步骤 10 相同,并且测定每一个孔在 450 \pm 10nm 波长下的吸光度。

[0209] 最终的反应稳定性。

[0210] 推荐在步骤 15 之后 30 分钟之内对所述孔进行读数。

[0211] 结果的计算。

[0212] 可以使用能够在 450 \pm 10nm 波长下测定吸光度的所有微孔读出器。通过以下方法获得每一个样品的睾酮值：

[0213] a. 使用线性 - 线性或半对数坐标纸,通过将每一种参考标准物的平均吸光度 (Y) 对它相应的以 ng/ml 为单位的浓度 (X) 作图来制做标准曲线。为了制做标准曲线,推荐使用四参数对数 (logistic) 函数。

[0214] b. 通过根据该标准曲线进行简单的插值法推算,利用每一种样品的平均吸光度测定相应的睾酮值,如果必要的话,乘以最初的样品稀度。

[0215] DRG ELIZA MAT3000 和 DRG 回归程序使得能够读出,并且利用四参数对数函数进行计算机辅助的解释。

[0216] 标准曲线的例子。

[0217] 以下数据只是用于说明的目的,并且不是要用于取代在测定时产生的数据。

[0218]

标准物	450nm 下的 OD
标准物 0 (0ng/ml)	1.79
标准物 1 (20ng/ml)	1.67
标准物 2 (100ng/ml)	1.33
标准物 3 (500ng/ml)	0.82
标准物 4 (1000ng/ml)	0.61
标准物 5 (2000ng/ml)	0.43

[0219] 性能特征灵敏度。

[0220] 图 6 表示用于循环的人海帕西啉原标准曲线的代表性的 ELISA,示出了以 ng/ml 为单位的的海帕西啉 - (28-47) 的浓度,以及 ELISA 溶液在 450nm 波长下的消光值。

[0221]

表2: DRG HEPICIDIN ELISA试剂盒的方法流程图

说明	标准物/样品 μl	生物素- 缓合物 μl	混合10秒钟。 于室温温育 60分钟。用 400 μl/孔 的稀释洗涤 溶液漂洗所 述孔3次。	链霉抗生物 素蛋白复合物 μl	于室温温育 30分钟。用 400 μl/孔 的稀释洗涤 溶液漂洗所 述孔3次。	底物溶液 μl	于室温温育 15分钟。	终止溶液 μl	用微量滴定 板读出器 读取450nm 的OD。
标准物0	50	50		100		100		100	
标准物1	50	50		100		100		100	
标准物2	50	50		100		100		100	
标准物3	50	50		100		100		100	
标准物4	50	50		100		100		100	
标准物5	50	50		100		100		100	
标准物6	50	50		100		100		100	
样品1	50	50		100		100		100	
样品2	50	50		100		100		100	
样品3	50	50		100		100		100	
样品4	50	50		100		100		100	
样品5	50	50		100		100		100	

[0222] 通过平均值减去零标准物的 21 次重复 (n = 21) 分析的 2SD (SD = 0.055) 计算分析灵敏度。

[0223] 所述测定的灵敏度为 3.95ng/ml。通过用零标准物稀释具有不同海帕西啉水平的样品（血清），评估所述测定的线性。通过 ELISA 测定稀释样品中的海帕西啉含量。对每一种样品进行三种稀释，并且计算百分比回收率。

[0224]

平均值 (ng/ml)	591.6	157.5	179.4
平均%回收率	99.1	107.9	104.6
%回收率范围	90.6-108.2	106.3-107.2	92.3-111.6

[0225] 在血清样品的三种不同的浓度下估计了海帕西啉的分析回收率。将逐渐加大量的未标记过的海帕西啉（50ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml）添加到具有各种起始海帕西啉浓度的样品中。测定每一种样品（未加料（spiked）和加料的）。测量海帕西啉浓度，并且计算百分比回收率。

[0226]

平均值 (ng/ml)	273.8	116.8	82.3
平均%回收率	93.1	94.7	97.1
%回收率范围	91.8-94.3	89.2-98.7	94.5-105.7

[0227] 通过对具有不同海帕西啉含量的三种对照样品进行重复测量（ $n = 12$ ），确定测定内的精度（在处理内）的变动。

[0228] 样品 1：平均值 = 426.7；SD = 20.2；CV(%) = 4.69

[0229] 样品 2：平均值 = 210.7；SD = 8.58；CV(%) = 4.07

[0230] 样品 3：平均值 = 110.7；SD = 4.74；CV(%) = 4.28

[0231] 通过对三种不同试剂盒批次中的三种不同的对照样品进行重复（ $n = 23$ ）测量（3x），确定测定间精度（处理间）的变动。

[0232] 样品 1：平均值 = 431.96；SD = 20.8；CV(%) = 4.82

[0233] 样品 2：平均值 = 216.17；SD = 14.44；CV(%) = 6.68

[0234] 样品 3：平均值 = 109.8；SD = 10.72；CV(%) = 9.76.

[0235] 实施例 2：海帕西啉在人肾脏中的表达

[0236] 海帕西啉是在远端肾小管中表达的，并且释放到尿中：

[0237] 普遍相信的是，铁体内稳态主要是通过对饮食铁的吸收在胃肠道中控制的，不过，最近的研究显示肾脏也参与了铁代谢。由于铁调节和抗微生物肽海帕西啉最初是从人尿中分离的，所以申请人研究了海帕西啉在哺乳动物肾脏中的细胞和亚细胞定位，并且开发了用于分析血清和尿中海帕西啉原浓度的 ELISA 测定。

[0238] 通过 RT-PCR，蛋白印迹和免疫细胞化学用海帕西啉特异性多克隆抗血清在人、小鼠和大鼠肾脏中证实了海帕西啉的表达和细胞定位。通过灵敏的 ELISA 测定了它的血清和尿浓度。

[0239] 海帕西啉是在人，小鼠和大鼠肾脏中表达。用区域 - 特异性抗血清进行的蛋白印迹分析，鉴定了大约 9.5kDa 的肽，相当于海帕西啉原的表观分子量。定位研究发现了海帕西啉是在肾皮质和肾外部髓质远端小管中表达的。在亚细胞水平上，海帕西啉定位于分泌型小管细胞的顶膜区域中，根据它在尿中的额外存在，很显然它是从顶端释放到尿中的。在患有 CRI 的患者体内测定到了较高水平的海帕西啉原（156.8ng/ml，健康志愿者 104.2ng/ml），表明了肾脏可能代谢和 / 或消除循环激素。

[0240] 根据海帕西啉在哺乳动物肾脏中的表达，申请人得出的结论是，铁调节激素海帕

西啉是固有的肾脏肽,它不仅是由肾脏消除 / 代谢的,而且还是在肾小管系统中合成的,并且通过管腔释放到尿中. 海帕西啉在肾脏中的定位,暗示了这种肽在肾小管系统中的调节作用.

[0241] 前言

[0242] 最新的研究业已发现了异常的海帕西啉表达 (Muckenthaler 等, (2003) *Nat Genet*, 34 :102-107) 以及在 HFE- 相关的血色素沉着病中受到破坏的海帕西啉调节 (Bridle 等, (2003) *Lancet*, 361 :669-673 ;和 Kulaksiz 等, (2003) *Gut*, 待发表) 以及海帕西啉突变与严重的青少年血色素沉着病的相关 (Roetto 等, (2003) *Nat Genet*, 33 :21-22). 根据以上发现,业已提出了海帕西啉是铁体内稳态的关键成分,它起着小肠中铁吸收和铁从巨噬细胞中释放的负调节剂的作用 (Nicolas 等 (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 4596-4601).

[0243] 尽管大部分研究集中在海帕西啉生产的主要位点肝脏中海帕西啉的调节和功能方面 (Park 等 ;Kulaksiz 等, (2003) *Gut*, 待发表),但积累的证据表明,这种肽还可能在肾脏和尿道中起作用 (同前, Wareing 等, (2003) *Am J Physiol Renal Physiol*, Epub ahead of print ;和 Ferguson 等, (2003) *Kidney Int*, 64 :1755-1764). 人们普遍相信,铁体内稳态主要是在胃肠道中在从饮食中吸收的水平上控制的. 现有的见解是,在生物体内不存在铁的排泄途径. 不过,最近的研究业已发现,肾脏在铁体内稳态中起着重要作用 (Wareing 等, (2003) *Am J Physiol Renal Physiol*, Epub ahead of print ;Ferguson 等, (2003) *Kidney Int*, 64 :1755-1764 ;和 Gunshin 等, (1997) *Nature*, 388 :482-488) ;血清中显著比例的铁可用于由肾小球超滤,并且从肾小球中过滤的大部分铁被再次吸收 (Wareing 等, (2000) *J Physiol*, 524. 2 :581-586)。

[0244] 因此,可以合理地分析海帕西啉是否还作为局部肽存在于肾脏中. 因此,申请人业已制备了针对海帕西啉前体分子的各种表位的抗血清,并且在转录和翻译水平上研究了三种哺乳动物物种. 我们的发现表明,除了肾脏中血清海帕西啉的消除之外,所述肽还作为内在激素在哺乳动物肾脏的远端小管细胞中表述,并且通过管腔释放到尿中,表明了海帕西啉在肾脏和 / 或尿道中的调节作用.

[0245] 材料和方法

[0246] 组织和组织制备:用于本研究的人肾脏样品 ($n = 5$) 是在患有肾上腺样瘤的成年患者体内进行肾脏切除术之后获得的. 用于本研究的人肝脏样品 ($n = 7$) 是在患有肝脏转移的成年患者体内进行半肝切除术之后获得的 (Kulaksiz 等, (2003) *Gut*, 待发表). 在 4% 多聚甲醛或在布安氏固定剂中固定健康组织,以便进行免疫组织化学分析,或马上在液氮中冷冻以用于进行 RT-PCR 和蛋白印迹. 对大鼠 ($n = 5$) 和小鼠 ($n = 5$) 进行麻醉,随后通过颈脱位法处死. 将来自肾脏和肝脏的组织样品切除,并且马上在液氮中冷冻,以便进行 RT-PCR 或蛋白印迹分析,或者在多聚甲醛中固定.

[0247] 肽合成,免疫步骤和抗体:根据公开的海帕西啉原序列 (Krause 等, (2000) *FEBS Lett*, 480 :147-150 ;Pigeon 等, (2001) *J Biol Chem*, 276 :7811-7819), 使用标准 Fmoc 方法合成了作为 C 末端酰胺的肽海帕西啉-(28-47) 和海帕西啉-(70-84) (Kulaksiz 等, (2002) *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 :6796-6801 ;和 Kulaksiz 等, (2002) *Am J Pathol*, 161 :655-664). 利用间马来酰亚胺基苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯将肽偶联在匙孔血蓝蛋白上,并且用每一种肽缀合物 (Eurogentec, Seraing, 比利时) 对两只 SPF 兔

(CharlesRiver-Iffa Credo) 进行免疫。业已生成、表征、并且使用了抗体 EG(1)-HepC, EG(2)-HepC[分别针对海帕西啶原-(70-84)], 和 EG(1)-HepN 和 EG(2)-HepN[分别针对海帕西啶原-(28-47)] (Kulaksiz 等, (2003)Gut, 待发表)。

[0248] 在肾脏中的表达分析: 根据 GenBank cDNA 序列, 构建并且使用了以下引物: 沿 5' → 3' 方向提供的人海帕西啶 (数据库编号 NM021175), 5'-CTG CAA CCC CAG GAC AGA G-3' 和 5'-GGA ATA AAT AAG GAA GGGAGG GG-3'; 大鼠海帕西啶 (#NM053469), 5'-ACA GAA GGC AAG ATGGCA CT-3' 和 5'-GAA GTT GGT GTC TCG CTT CC-3', 小鼠海帕西啶-1 (#NM032541), 5'-CGA TAC CAA TGC AGA AGA GAA GG-3' 和 5'-TTCAAG GTC ATT GGT GGG GA-3'。所述引物与任何以前报道的序列都不具备同源性。

[0249] 用 Qiagen RNeasy 试剂盒进行 RNA 分离, 包括 DNA 消化。按以前描述的方法进行逆转录 (RT)-PCR 分析 (Kulaksiz 等, (2002)Proc Natl Acad Sci USA, 99:6796-6801; 和 Kulaksiz 等, (2002)Am J Pathol, 161:655-664)。在 94°C 下进行最初的变性 4 分钟之后, 对反应物进行 30 轮以下热程序: 94°C 进行 30 秒, 60°C 进行 30 秒和 72°C 进行 30 秒; 在该循环之后在 72°C 下进行最后 5 分钟的延伸。扩增产物在溴化乙锭染色的 1.8% 89mM Tris/89mM 硼酸 /2mMEDTA (pH8.3) 琼脂糖凝胶上进行电泳。作为特异性对照, 通过 MWG-Biotech 对扩增的 PCR-产物进行测序。

[0250] 免疫印迹分析: 在 16.5% N-[2-羟-1,1-二羟甲基乙基] 甘氨酸-SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行蛋白印迹实验。来自人, 小鼠和大鼠肾脏和肝脏的蛋白以及来自人尿的蛋白 (每一个实验 50ml) 是按照公开的方法提取的 (Kulaksiz 等, (2003)Gut, 待发表; Kulaksiz 等, (2002)Proc Natl Acad Sci USA, 99:6796-6801; 和 Kulaksiz 等, (2002)Am J Pathol, 161:655-664)。在电泳之后, 通过半干印迹将蛋白转移到基于疏水性聚偏 1,1-二氟乙烯的膜上 (Pall, Portsmouth, England)。所述膜与以 1:1000 的比例稀释的海帕西啶抗体一起温育过夜。在用含有 10mM Tris-HCl (pH8.0), 150mMNaCl 和 0.05% Tween20 的 Tris-缓冲的盐溶液洗涤之后, 通过用氮蓝四唑和 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸作为色原 (Sigma) 与碱性磷酸酶-缀合的山羊抗-兔抗体 (稀释比为 1:50,000; Sigma) 温育之后显现免疫反应性蛋白。在使相应的肽免疫原与所述抗体预温育之后, 对蛋白印迹上的免疫反应进行了特异性的抑制。通过合适的对照排除了与第二山羊抗-兔抗体的交叉反应性 (Kulaksiz 等, (2002)Proc Natl AcadSci USA, 99:6796-6801; 和 Kulaksiz 等, (2002)Am J Pathol, 161:655-664)。

[0251] 免疫细胞化学方法: 在 4°C 下将组织在 4% 多聚甲醛或布安氏固定液中固定 18 小时, 并且包埋在石蜡中。通过抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物 (ABC) 技术对石蜡切片 (4-5 μm) 进行海帕西啶 (抗体 EG(1)-HepN, EG(2)-HepN, EG(1)-HepC, 和 EG(2)-HepC, 分别以 1:2000 的比例稀释) 的免疫染色; 温育序列以及抗原-抗体结合位点的显现是按详细描述的方法进行的 (Kulaksiz 等, (2003)Gut, 待发表; Kulaksiz 等, (2002)Proc Natl Acad Sci USA, 99:6796-6801; 和 Kulaksiz 等, (2002)Am J Pathol, 161:655-664)。简单地讲, 在 4°C 下将所述切片与各自的抗体一起温育 24 小时, 然后与以 1:200 的比例稀释的生物素化的抗-兔 IgG (JacksonImmunoResearch, West Grove, Pa., 美国) 一起温育 30 分钟。然后将所述切片与预先形成的生物素-过氧化物酶/链霉抗生物素蛋白混合物 (JacksonImmunoResearch) 一起温育 30 分钟, 后者稀释在 PBS 中 (最终浓度: 生物素-过氧

化物酶, 0.7 μ g/ml; 链霉抗生物素蛋白, 5 μ g/ml)。通过在用 0.05M Tris-HCl (pH7.6) 制备的 0.7mM 二氨基联苯胺盐酸盐 / 0.002% H_2O_2 中温育所述切片检测抗原-抗体结合位点。

[0252] 特异性对照: 通过按公开方法进行的对照, 排除了依赖于方法的非特异性 (Kulaksiz 等, (2003)Gut, 待发表)。通过用同种和异种抗原性肽预吸收所述抗体, 检测抗体特异性 (6.25-100 μ g/ml 的抗血清) (Kulaksiz 等, (2002)Proc Natl Acad Sci USA, 99:6796-6801; 和 Kulaksiz 等, (2002)Am J Pathol, 161:655-664)。用低到 6.25 μ g/ml 的浓度的同种抗原对所述抗体的预吸收完全阻断了在肾脏中的免疫染色, 而用浓度最高为 100 μ g/ml 的同种抗原对所述抗体进行预吸收对免疫染色没有作用。

[0253] 海帕西啉 ELISA 竞争结合测定: 血清和尿样品是从 22 位个体 (11 位女性, 11 位男性, 年龄在 23-59 岁之间, 平均年龄为 39 岁) 体内获得, 并且从 22 位患有肾机能不全的进行长期血液透析的患者 (11 位女性, 11 位男性, 年龄在 25-77 岁之间, 平均年龄为 48 岁) 体内获得血清样品。所有患有慢性肾机能不全的患者每周用 3,000IE 重组人促红细胞生成素 (EPO) 进行 2-3 次治疗。在收集样品期间, 要注意健康志愿者和患者没有感染, 并且不流血。将 10ml 血液样品抽入血清试管中, 并且将 10ml 尿样品收集到尿试管中, 在 4°C 下以 2,500 \times g 的速度离心 10 分钟。按上述方法用 96 孔微量滴定板进行重复测定 (8)。简单地讲, 用 200 μ l / 孔兔抗-海帕西啉抗体 EG(2)-HepN 对微量滴定板进行涂覆, 所述抗体是以 1:4000 的比例稀释的。将 50 μ l 含有各种量的合成肽 (0, 20, 100, 500 和 1000ng/ml) 的标准物或人血清和尿样品以及 150 μ l N-末端生物素化的海帕西啉-(28-47) (Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg, 德国) (2ng/孔) 添加到每一个孔中, 并且在室温下温育 1 小时。在用 TBST (含有 0.05% Tween20 的 TBS) 洗涤之后, 通过链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶 (Dako, Hamburg, 德国) 使用底物四甲联苯胺 (DRG Instruments GmbH, Marburg, 德国) 检测生物素化的抗原-抗体复合物; 用 1M H_2SO_4 终止显色反应, 并且在 450/630nm 波长下读出该溶液的消光值。

[0254] 统计学分析: 数据是以平均值 \pm SEM 形式表示的。通过斯氏 t-检验评估了所述统计学分析。P<0.05 的差异被认为是显著的。

[0255] 结果

[0256] 海帕西啉在哺乳动物肾脏中的表达: RT-PCR 分析揭示了海帕西啉的明确表达不仅存在于肝脏中 (正对照, 参见 Kulaksiz 等, (2003)Gut, 待发表), 而且还存在于人, 大鼠和小鼠肾脏中 (图 10)。在这些物种的肝脏 (数据未显示) 和肾脏中检测到了预期的人的 192-bp 的 PCR 产物, 小鼠的 193-bp 产物, 大鼠的 201-bp 的产物。序列分析发现所述 PCR 产生的产物与相应的肽 cDNA 具有完全的同源性。

[0257] 在翻译水平上, 通过用区域特异性抗体进行的蛋白印迹研究证实了海帕西啉的存在 (图 10)。针对海帕西啉前体分子的 C 和 N 末端的抗血清一致地鉴定了在人, 大鼠和小鼠肾脏提取物中存在大约 9.5kDa 的免疫反应性带。

[0258] 海帕西啉的细胞定位: 用区域特异性海帕西啉抗血清进行的免疫组织化学研究一致地将海帕西啉定位于人, 小鼠和大鼠肾脏的远端小管系统中 (图 11-15)。近端肾脏小管, 集合小管和肾小球完全缺少海帕西啉免疫反应性。免疫反应性远端小管局限于肾皮质和外部肾髓质, 内部肾髓质没有表现出海帕西啉的免疫染色 (图 11, 12)。值得注意的是, 在海帕西啉阳性小管细胞之间存在明显的细胞间差异: 尽管大部分小管细胞对海帕西啉是呈强阳

性的,但其中的某一些只表现出微弱的免疫反应性,或对海帕西啉完全无反应(图14)。很显然,在研究过的所有切片中,海帕西啉抗血清发现了在沿远端小管排列的上皮细胞的细胞质中颗粒状的免疫反应性模式(图11,12)。在某些组织中,海帕西啉阳性细胞表现出强免疫反应性,集中在分泌性细胞的顶极(图13,15),而在各个细胞的基底外侧膜区域中没有发现免疫反应性。

[0259] 检测血清和尿中的海帕西啉前肽:用特异性N-末端海帕西啉抗体EG(2)-HepN开发了高可再现性和高灵敏度的稳定的海帕西啉ELISA测定(Kulaksiz等,(2003)Gut,待发表)。如图16所示,ELISA发现了海帕西啉原存在于人血清中。在健康受试者血清中测得的海帕西啉原在68.5-139.2ng/ml范围内(平均值 \pm SE;104.2 \pm 19.5ng/ml)。在患有慢性肾机能不全的患者血清中海帕西啉原浓度在63.9-327.3ng/ml范围内变动(平均值 \pm SE;156.8 \pm 61.9ng/ml),并且与对照组相比明显提高了。

[0260] 使用灵敏的海帕西啉ELISA测定的来自对照组的人尿中的海帕西啉原在13.9-456.0ng/ml范围内(平均值 \pm SE;180.1 \pm 94.8ng/ml)。海帕西啉原在人尿中的存在还通过蛋白印迹分析得到了证实。海帕西啉抗血清在人尿提取物中鉴定到一个大约9.5kDa分子量的海帕西啉免疫反应性带,它与肾脏组织中的免疫反应性海帕西啉共迁移(图10)。

[0261] 讨论

[0262] 新的激素海帕西啉是抗微生物肽,并且是铁体内稳态的关键调节剂(Park等,(2001)J Biol Chem,276:7806-7810;Krause等,(2000)FEBS Lett,480:147-150;Pigeon等,(2001)J Biol Chem,276:7811-7819;Nicolas等,(2001)Proc Natl Acad Sci USA,98:8780-8785;和Nicolas等,(2002)Proc Natl Acad Sci USA,99:4596-4601)。在以前的研究中,业已显示肝脏是海帕西啉的主要来源(Park等,CH(2001)J Biol Chem,276:7806-7810;和Kulaksiz等,(2003)Gut,待发表)。尽管海帕西啉最初是从人尿(Park等,(2001)和hemofiltrate(Krause等,(2000))中分离的,但在肾脏中没有检测到这种调节肽的表达(Pigeon等,(2001))。

[0263] 使用成功地应用于肝脏中的合适的引物说明和组合(Kulaksiz等,(2003)Gut,待发表;和Gehrke等,(2003)Blood,102:371-376),本发明的RT-PCR分析明确地揭示了海帕西啉不仅是在肝脏中表达的,而且还在三种哺乳动物物种-人,大鼠和小鼠的肾脏中表达。测序分析揭示了所生成的PCR产物的特异性。

[0264] 为了证实翻译的海帕西啉肽在肾脏中的存在,申请人制备了针对海帕西啉的大量的区域特异性抗血清,并且将它们用于蛋白印迹分析和免疫组织化学分析。蛋白印迹分析证实了海帕西啉在肾脏中的表达。四个不同的抗血清能识别海帕西啉前体分子上的不同的表位,一致地鉴定了存在于三种不同物种的肾脏中的大约9.5kDa的免疫反应性肽,它相当于根据各自的cDNA序列推测的海帕西啉激素原的分子量(Pigeon等,(2001))。这种免疫反应性肽的表观分子量还与在肝脏中检测的海帕西啉激素原的分子量一致(Kulaksiz等,(2003)Gut,待发表)。申请人的发现明确地证实了海帕西啉不是肝脏特异性的,因为它还存在于肾脏中。

[0265] 用四种区域特异性海帕西啉抗血清进行的免疫细胞化学研究揭示在人,小鼠和大鼠肾脏中海帕西啉特异性地定位于肾皮质和外部髓质的小管系统中。这些免疫反应性小管被鉴定为远端肾小管,这些是根据在光学显微镜术中检测到的它们的典型的形态学特征

确定的。不同区域特异性抗体的一致性的染色不仅存在于人体中,而且还存在于小鼠和大鼠肾脏中,表明了远端小管是肾脏海帕西啉的来源。在近端肾脏小管,集合小管和肾小球或肾脏内部髓质中没有检测到对海帕西啉的免疫反应性。

[0266] 在肾皮质和外部髓质中,海帕西啉免疫反应性局限于远端小管的上皮分泌细胞中。很显然,所有海帕西啉抗血清产生了颗粒状免疫反应性模式,所述模式假定这种肽定位于各个细胞的小分泌性小泡或溶酶体中,这业已通过电子显微镜术在这些细胞中得到了鉴定 (vanKatachalan MA, Kritz W: Pathology of the kidney. Edited by JC Jennette, JL Oldson, MM Schwarz, SG Silver: Philadelphia, Heptinstall's, 1998, pp3-66)。应当指出的是,即使是在相同小管的上皮细胞之间也存在明显的细胞间差异,这些差异表现在海帕西啉免疫反应性强度方面,这可能反映了表达或分泌的细胞间差别。很显然,在某些小管中,海帕西啉的免疫反应性定位于上皮细胞的整个细胞质中,而在其他小管中,强的海帕西啉免疫反应性集中在分泌性细胞的顶极。海帕西啉在细胞水平上的这种奇特的分布模式,可能推测了海帕西啉的管腔定向释放。申请人没有在肾小管细胞的基底外侧膜区域上检测到海帕西啉表达。这表明了肾脏海帕西啉不是通过沿小管排列的分泌细胞释放到血液中的。

[0267] 普遍相信的是,身体的铁体内稳态的控制主要依赖于对在近端小肠中从饮食中摄取的铁的严格调节。不过,最近的研究业已证实,肾脏在铁体内稳态方面发挥重要作用 (Wareing 等, (2003) Am J Physiol Renal Physiol, Epub ahead of print; Ferguson 等, (2003) Kidney Int, 64: 1755-1764; 和 Gunshin 等, (1997) Nature, 388: 482-488)。Wareing 及其同事能够令人信服地证实代谢上显著量的铁是在肾小球上过滤的,并且只有 0.8-1.5% 的过滤的铁实际上被排泄到尿中 (Wareing 等, (2000) J Physiol, 524. 2: 581-586)。因此,必然存在沿肾小管再吸收铁的非常有效的途径和严格的控制作用。实际上, Ferguson 和他的同事能够将所述二价金属转运蛋白 1 (DMT-1) 定位于肾脏的小管系统中 (Ferguson 等, (2001) Am J Physiol Renal Physiol, 280: F803-F814)。这种蛋白被认为是通过胃肠道吸收饮食铁的主要途径 (Gunshin 等, (1997))。应当指出的是,业已证实 DMT-1 表达在肾皮质和外部髓质小管细胞的顶膜区域中最强,在这里申请人还发现了海帕西啉。另外,最近的研究证实了改变了的饮食铁吸收能有效调节肾脏 DMT-1 表达 (Wareing 等, (2003))。根据以上发现和数据,所述发现和数据证实了海帕西啉表达与十二指肠 DMT-1 的表达成反比例关系 (Frazer 等, (2002) Gastroenterology, 123: 835-844), 申请人提出了海帕西啉在肾脏铁转运方面的调节作用。

[0268] 通过蛋白印迹研究证实了海帕西啉可能释放到尿中。区域特异性海帕西啉-抗血清一致地鉴定了具有正确分子量的高度标记过的带 (Kulaksiz 等, (2003) Gut, 待发表), 它是与肾脏组织提取物中的免疫反应性海帕西啉原精确共迁移的。以上发现明确地显示海帕西啉原是通过分泌性远端小管细胞合成的,并且通过管腔释放到尿中,在这里,它显然逃脱了小管的蛋白水解和再循环。为了测量人尿中的海帕西啉原浓度,开发了灵敏的 ELISA, 其检测灵敏度为 3.95ng/孔。业已成功地应用在 ELISA 实验中的海帕西啉抗血清 EG(2)-HepN 进行的 ELISA 分析 (Kulaksiz 等, (2003) Gut, 待发表), 发现了在健康受试者尿中 13.9-456.0ng/ml (平均值 \pm SE; 180.1 \pm 94.8ng/ml) 的高浓度的海帕西啉原。这种浓度显著高于同一个人的循环中的海帕西啉原浓度 (68.5-139.2ng/ml; 平均值 \pm SE,

104.2±19.5ng/ml)。应当指出的是,没有发现在循环的海帕西啉原和血清铁或铁蛋白水平之间的相关性 (Kulaksiz 等, (2003)Gut,待发表)。同样,没有检测到尿海帕西啉原和血清铁或铁蛋白水平之间的相关性 (数据未显示),所述铁蛋白水平被推测能调节肝脏海帕西啉的表达 (Pigeon 等, (2001)J Biol Chem,276 :7811-7819 ;Nemeth 等, (2002)Blood,101 :2461-2463 ;和 Ganz T, (2003)Blood,102 :783-788)。因此,申请人提示肾脏 / 尿的海帕西啉原的调节作用不会受到血清铁或铁蛋白的直接影响。

[0269] 对进行长期血液透析的肾机能不全患者进行的海帕西啉原作用的评估,发现了在这些患者血清中的海帕西啉原的浓度明显提高了,从健康受试者的 104.2ng/ml 提高到 156.8ng/ml。透析患者体内提高了的海帕西啉原水平,表明肾脏不仅与海帕西啉的合成相关,而且可能还与所述循环肽的代谢和 / 或消除相关。有趣的是,在现在的研究中,业已显示肾脏激素促红细胞生成素能下调肝脏的海帕西啉基因表达 (Nicolas (2002)Blood Cells, Molecules, and Diseases,29 : 327-335)。因此,对在透析患者体内提高了的海帕西啉原浓度的另一种解释可能是促红细胞生成素的相对缺乏,这种现象是在晚期肾机能不全中通常遇到的 (Eckardt KU, (2000)Clin Nephrol,53 :S2-8 ;和 Santoro A :(2002)Rev Clin Exp Hematol, Suppl1 :12-20)。不过,申请人报道了在患有慢性肾机能不全患者体内测得了高水平的海帕西啉原,尽管用海帕西啉抑制性激素促红细胞生成素对这些患者进行了治疗,这支持海帕西啉的肾脏过滤。本发明的一种实施方案提供了尿海帕西啉部分来源于肾脏,并且部分来源于肝脏 ;因此,必须指出的是,测得的尿海帕西啉原是释放的肾脏肽和消除的循环肽的总和。

[0270] 综上所述,最近的研究证实了肾脏在铁体内稳态方面发挥重要作用 (Wareing 等, (2003)Am J Physiol Renal Physiol, Epub ahead of print ;Ferguson 等, (2003)Kidney Int,64 :1755-1764 ;Gunshin 等, (1997)Nature,388 :482-488 ;Wareing 等, (2000)J Physiol,524.2 :581-586 和 Ferguson 等, (2001)Am J PhysiolRenal Physiol,280 :F803-F814),不过,不存在有关肾脏铁转运的调节机制的证据。在这一方面,申请人第一次将海帕西啉定位于三种哺乳动物物种的肾脏中。申请人的发现表明了海帕西啉不是肝脏特异性的。除了肾脏中血清海帕西啉的消除之外,所述肽还作为内在的激素在肾脏的分泌性远端小管细胞中产生,并且通过管腔释放到尿中,这暗示了海帕西啉在肾脏和 / 或尿道中的调节作用。进一步的研究应当分析海帕西啉在肾脏小管系统中的调节机制。

[0271] 实施例 3 :海帕西啉在人胰腺中的表达

[0272] 用于本研究的胰腺组织是在对患有胰腺癌的患者实施惠普耳 (Whipple) 手术之后获得的。使用成功地应用在肝脏和肾脏中的合适的引物说明和组合,本发明的 RT-PCR 分析发现了海帕西啉不仅是在肝脏和肾脏中表达的,而且还能在人胰腺中表达。测序分析发现了所产生的 PCR- 产物的特异性。

[0273] 用特异性抗体进行的大部内印迹分析在翻译水平上证实了海帕西啉在胰腺中的表达。使用相同的抗体,通过免疫组织化学将海帕西啉定位于胰腺。石蜡切片发现海帕西啉免疫反应性定位于内分泌胰腺 ; 在外分泌胰腺中没有发现免疫反应性。

[0274] 工业应用性

[0275] 本发明可应用于诊断以非生理学水平的海帕西啉蛋白为特征的疾病状况,所述海帕西啉蛋白包括海帕西啉原和它的片段。

[0276] 尽管本发明业已结合具体实施方案进行了描述,但应当理解的是,这些实施方案仅仅是用于对本发明的原理和应用进行说明的,因此,应当理解的是,可以对所述说明性的实施方案进行多种修饰,并且,在不超出由所附权利要求书所述的本发明的精神和范围的前提下,可以设计出其他方案。

[0277] 本说明书所引用的所有专利和非专利文献可以作为本发明所属领域的技术人员技术水平的指示。上述所有文献和专利申请被以相同的程度收作本文参考,就如同每一份文献或专利申请被具体和分别指明收作本文参考一样。

[0001]

序列表

<110> DRG INTERNATIONAL, INC.

<120> 通过筛选人或动物组织、血液或体液中的海帕西啉来诊断疾病的方法，以及该方法的治疗性用途

<130> DRG 3.4-001 CIP CIP

<140>

<141>

<150> 10/441, 089

<151> 2003-05-19

<150> 10/299, 486

<151> 2002-11-19

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 391

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

```

tcaagaccca gcagtgggac agccagacag acggcacgat ggcaactgagc tccagatct 60
gggcoegtgt cctctgctc ctctctctcc togccagcct gaccagtggc totgttttcc 120
cacaacagac gggacaactt gcagagctgc aaccccagga cagagctgga gccagggccca 180
gttggatgcc catgttccag aggcgaagga ggcgagacac ccaattcccc atctgcattt 240
totgtctcgg ctgctgtcat cgatcaaagt gtgggatgtg ctgcaagacg tagaacctac 300
ctgcocctgcc ccctccccct ccttccctta tttattctgt ctgccccaga acataggtct 360
tggaataaaa tggctgggtc tttgttttc c 391

```

<210> 2

<211> 84

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

[0002]

Met Ala Leu Ser Ser Gln Ile Trp Ala Ala Cys Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Ser Leu Thr Ser Gly Ser Val Phe Pro Gln Gln Thr Gly
 20 25 30

Gln Leu Ala Glu Leu Gln Pro Gln Asp Arg Ala Gly Ala Arg Ala Ser
 35 40 45

Trp Met Pro Met Phe Gln Arg Arg Arg Arg Asp Thr His Phe Pro
 50 55 60

Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met
 65 70 75 80

Cys Cys Lys Thr

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Pro Gln Gln Thr Gly Gln Leu Ala Glu Leu Gln Pro Gln Asp Arg Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Arg Ala
 20

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr
 1 5 10 15

<210> 5

<211> 19

[0003]

<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: 引物	
<400> 5	
ctgcaacccc aggacagag	19
<210> 6	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: 引物	
<400> 6	
ggaataaata aggaaggag ggg	23
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: 引物	
<400> 7	
gattcagggt caggaggtg	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: 引物	
<400> 8	
gaagggctg tgattgaagg	20

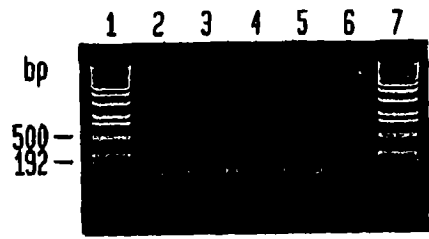


图 2A

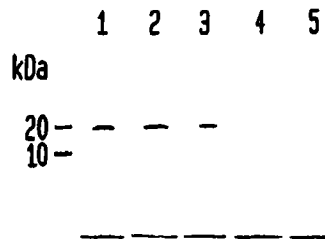


图 2B

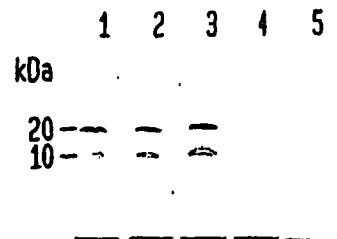


图 2C

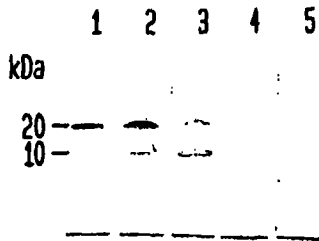


图 2D



图 3A



图 3B



图 3C



图 4A

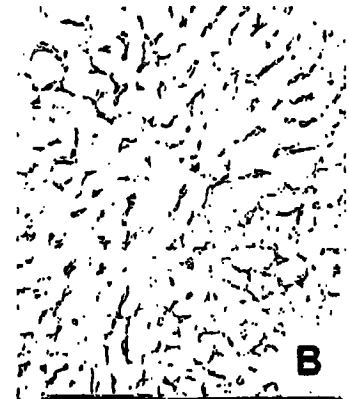


图 4B



图 4C

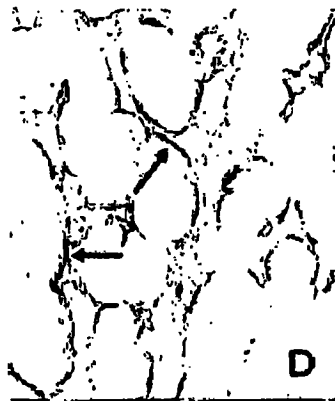


图 4D

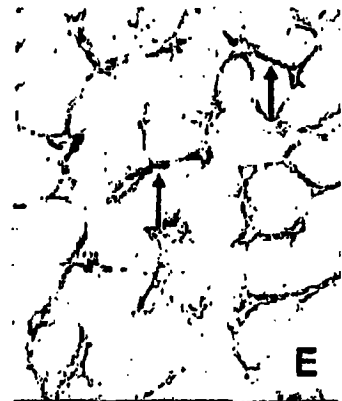


图 4E

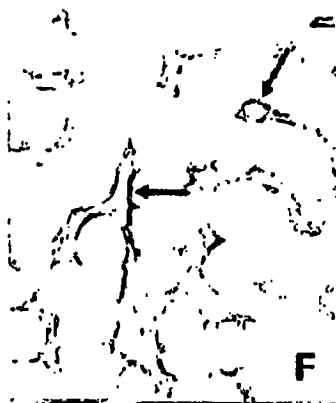


图 4F

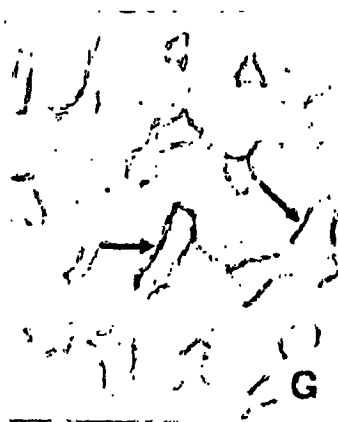


图 4G

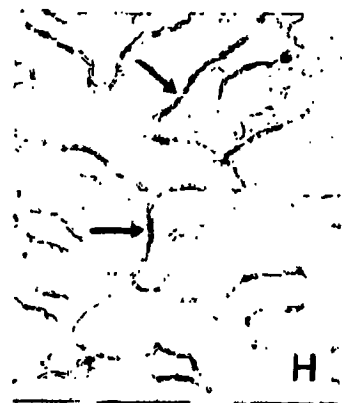


图 4H

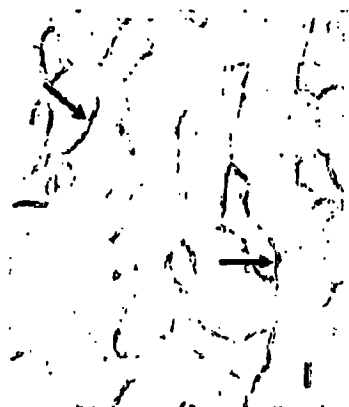


图 4I



图 5A

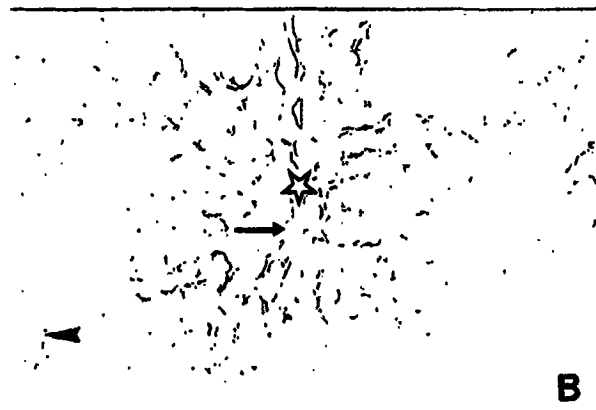


图 5B

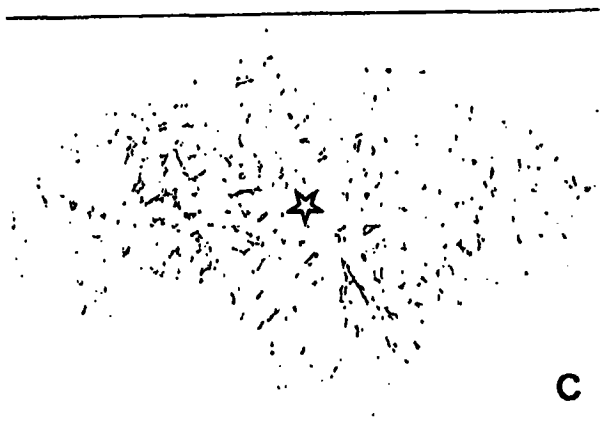


图 5C

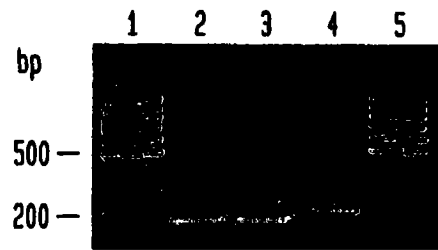


图 10A

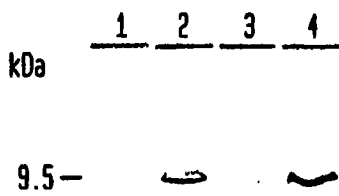


图 10B

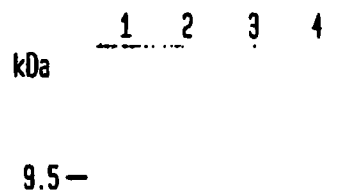


图 10C

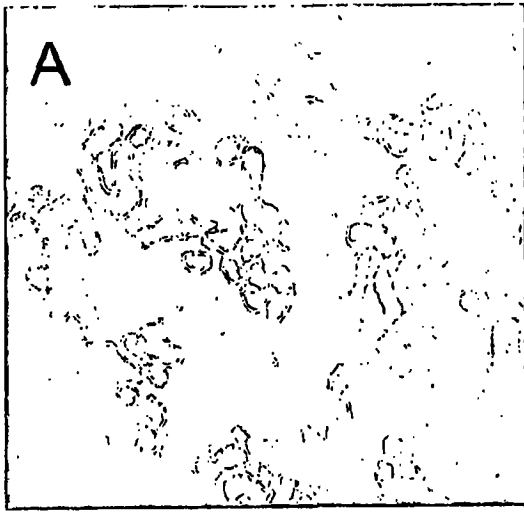


图 11A

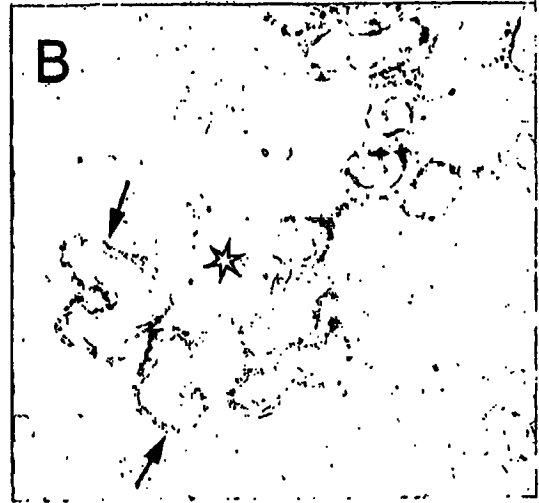


图 11B

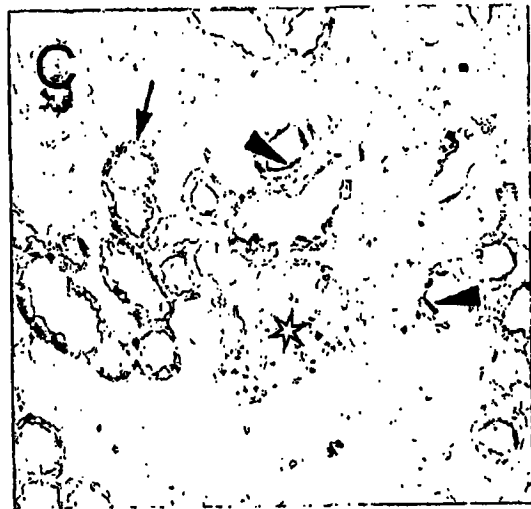


图 11C

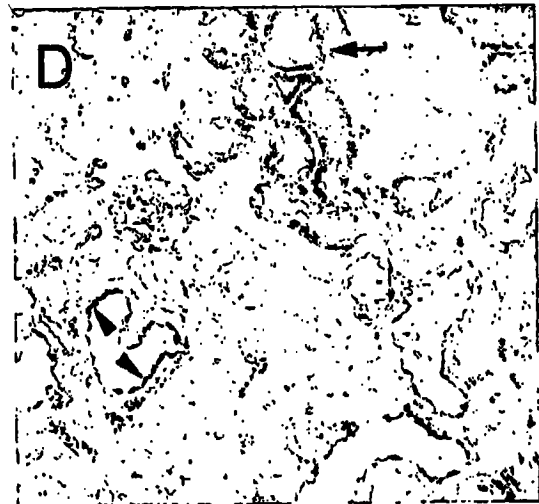


图 11D

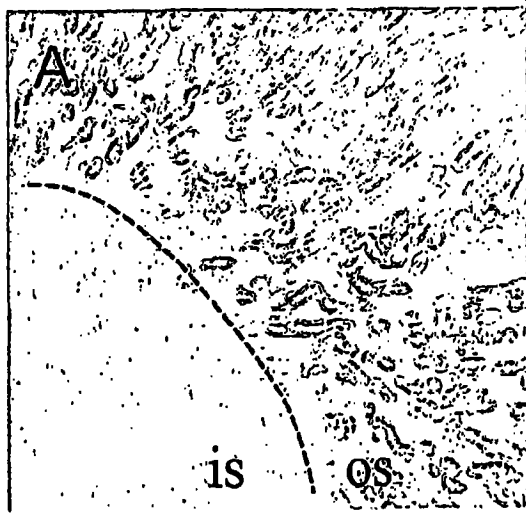


图 12A

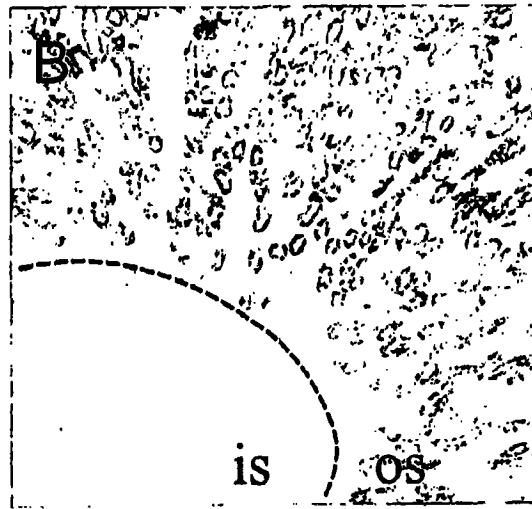


图 12B



图 12C

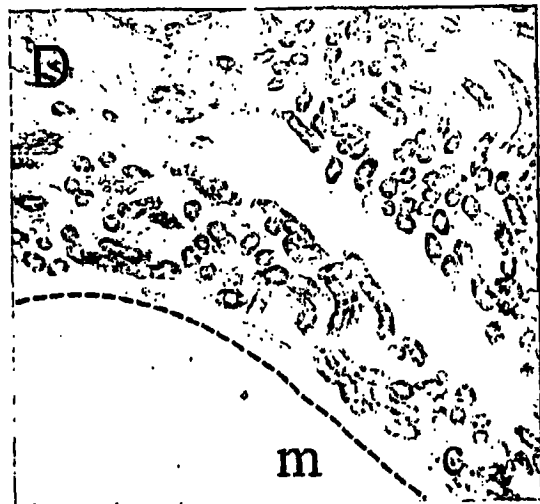


图 12D

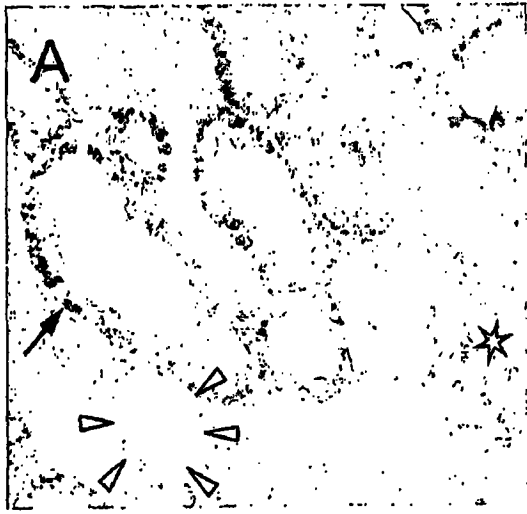


图 13A

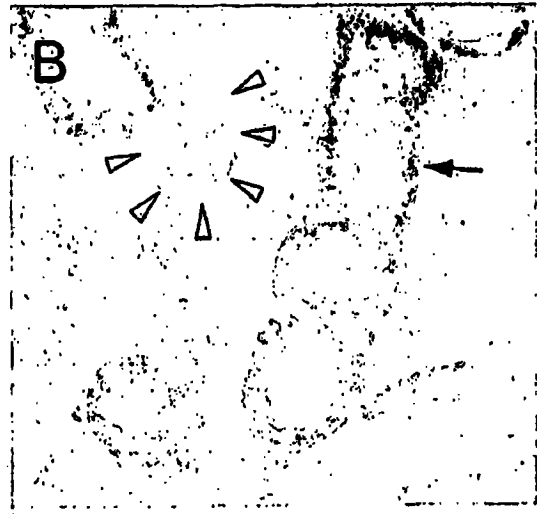


图 13B

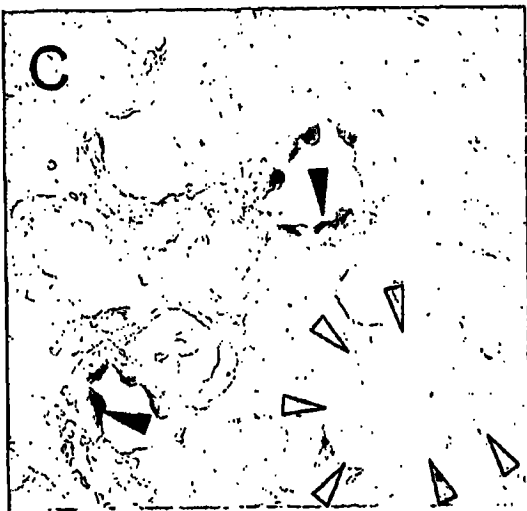


图 13C

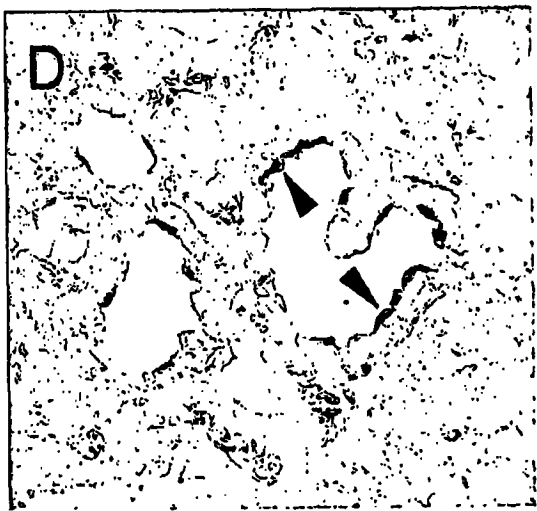


图 13D

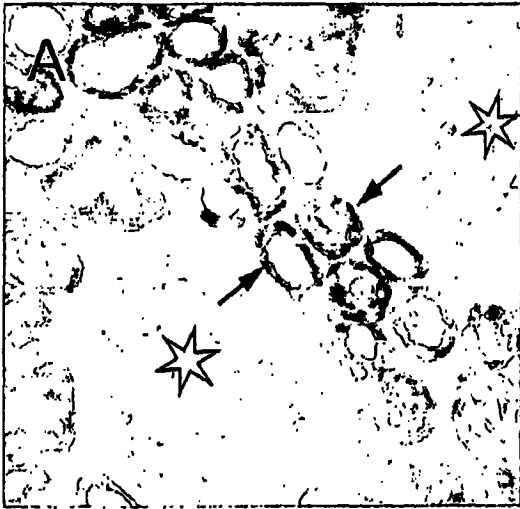


图 14A

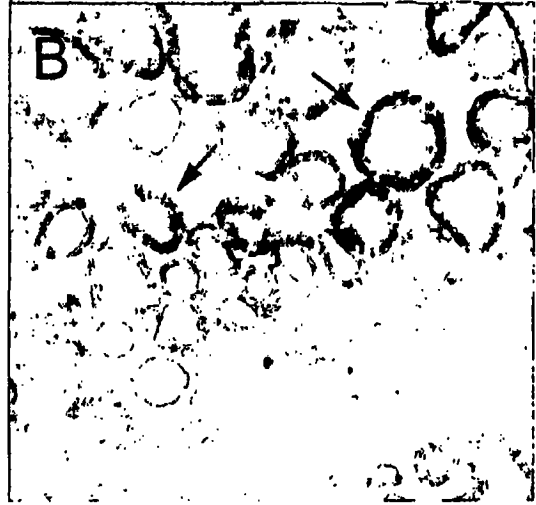


图 14B

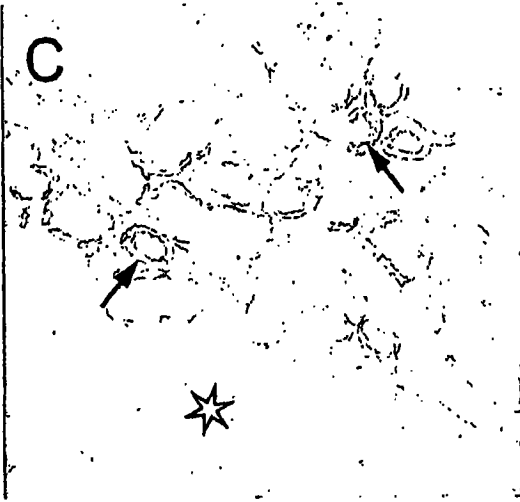


图 14C

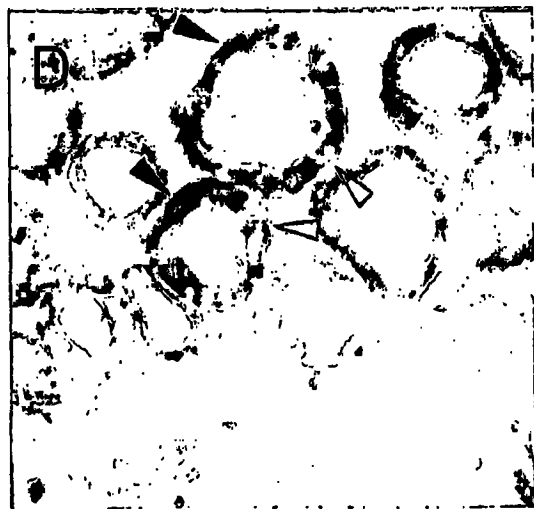


图 14D

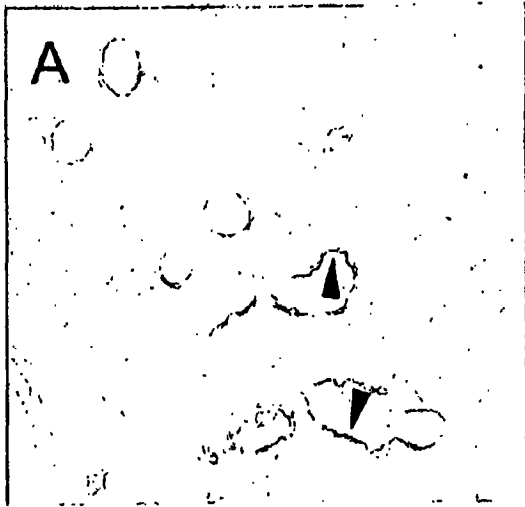


图 15A



图 15B



图 15C



图 15D

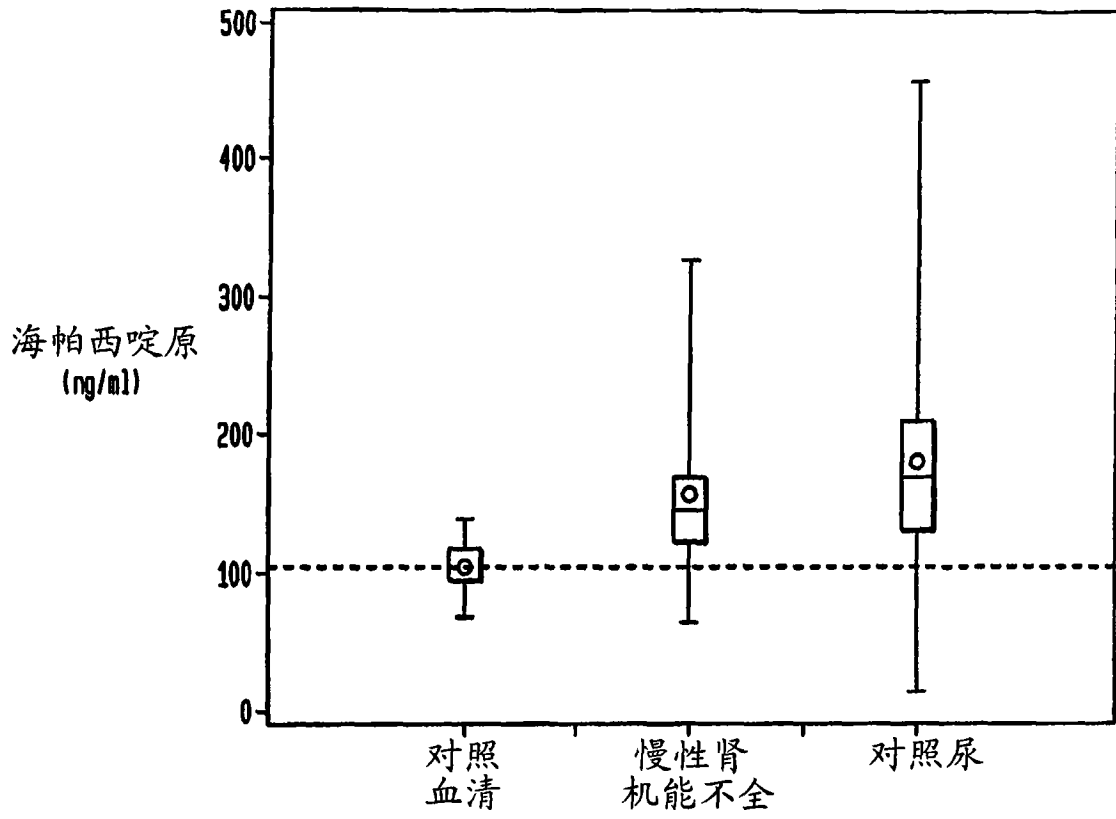


图 16

专利名称(译)	通过筛选人或动物组织、血液或体液中的海帕西啉来诊断疾病的方法,以及该方法的治疗性用途		
公开(公告)号	CN101076730B	公开(公告)日	2013-07-17
申请号	CN200380108964.8	申请日	2003-11-19
[标]发明人	H库拉克斯茨 CE吉钦托夫 A珍茨科 W施特雷梅尔		
发明人	H·库拉克斯茨 C·E·吉钦托夫 A·珍茨科 W·施特雷梅尔		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C12P21/08 C07K1/00 C07K16/18 C07K16/28 G01N33/68		
CPC分类号	C07K2317/34 G01N33/68 C07K16/26 G01N33/6878 Y10S435/975 C07K16/2881		
代理人(译)	刘玥		
优先权	10/299486 2002-11-19 US 10/441089 2003-05-19 US		
其他公开文献	CN101076730A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于诊断疫病状况的方法和试剂盒,所述疫病状况特征在于非生理学水平的海帕西啉,包括海帕西啉原和它的片段,该方法包括从受试者体内获得组织或流体样品;让所述样品与能特异性地结合相当于海帕西啉蛋白的中间部分或C末端的多肽的抗体或它的片段接触,并且利用基于所述抗体和所述多肽的结合的测定来定量海帕西啉水平;其中,所述非生理学水平的海帕西啉是所述疾病状况的指示。本发明还涉及用于遗传技术方法中的诊断方法和试剂盒,如用于超表达或下调海帕西啉。本发明还涉及通过用海帕西啉和海帕西啉的激动剂或拮抗剂治疗受试者对某些疾病进行的治疗性处理。

