

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-536364

(P2010-536364A)

(43) 公表日 平成22年12月2日(2010.12.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 B	4 B O 6 5
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 O 1 A	4 C O 8 5
C O 7 K 14/575 (2006.01)	C O 7 K 14/575	4 H O 4 5
C O 7 K 16/26 (2006.01)	C O 7 K 16/26	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-521489 (P2010-521489)	(71) 出願人	510048680
(86) (22) 出願日	平成20年8月22日 (2008. 8. 22)		ヘレニック パストゥール インスティテュート
(85) 翻訳文提出日	平成22年4月19日 (2010. 4. 19)		HELLENIC PASTEUR INSTITUTE
(86) 国際出願番号	PCT/GR2008/000056		ギリシャ共和国 アテネ ジーアールー 1
(87) 国際公開番号	W02009/027752		1 5 2 1, バシリシスソフィアスアベニュー 1 2 7
(87) 国際公開日	平成21年3月5日 (2009. 3. 5)	(71) 出願人	510048679
(31) 優先権主張番号	20070100553		ママラキ, アヴギ
(32) 優先日	平成19年8月24日 (2007. 8. 24)		MAMALAKI, Avgi
(33) 優先権主張国	ギリシャ (GR)		ギリシャ共和国 アテネ ジーアールー 1
			0 6 8 3, スピリドノストアリコウピストリート 4 3
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチドホルモンの生成工程

(57) 【要約】

本発明は、ピキアパストリスにおいて生物学的機能性ヘプシジンを生産する新規な方法を提供する。本発明は、さらに、新規な標識ヘプシジン、抗体、並びに、治療及び免疫学的分析においてそれらを使用する方法を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的機能性ヘブシジン又は生物学的機能性ヘブシジン誘導体を生産する方法において、真核性メチロトローフ酵母（好ましくはピキアパストリス）であることを特徴とする発現系内において外因的にヘブシジン又はヘブシジン誘導体を発現させるステップを具える方法。

【請求項 2】

生物学的機能性ヘブシジン又は生物学的機能性ヘブシジン誘導体を生産する方法において、発現系内においてヘブシジン又はヘブシジン誘導体を発現させるステップを具え、C末端に少なくとも1つの標識を有するように前記ヘブシジンを提供する方法。

10

【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法において、前記標識はポリヒスチジン標識（6 X H i s - 標識）である方法。

【請求項 4】

請求項 2 に記載の方法において、前記標識は m y c - H i s 標識である方法。

【請求項 5】

請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載の方法において、リンカーを介して間接的に前記標識を設けたことを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 2、3、4 又は 5 のいずれかに記載の方法において、前記発現系内において生物学的機能性標識ヘブシジン又は生物学的機能性標識ヘブシジン誘導体を外因的に発現させるステップを具え、該発現系が、真核性メチロトローフ酵母（好ましくはピキアパストリス）である方法。

20

【請求項 7】

請求項 1 又は 6 のいずれかに記載の方法において、発現に先立って、前記発現系（好ましくは真核性メチロトローフ酵母、より好ましくはピキアパストリス）にヘブシジンをコードするポリヌクレオチド挿入物を含むベクターを導入するステップを具える方法。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法において、前記ベクターが p P I C Z a A、p P I C Z a B 又は p P I C Z a C である方法。

30

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法において、該方法は、発現されたヘブシジンを精製するための 2 段階の工程をさらに具える方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法において、前記第 1 段階は金属親和性クロマトグラフィーを具える方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法において、前記金属がニッケル又はコバルトである方法。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の方法において、前記ニッケルが N T A で配位されている方法。

40

【請求項 13】

請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法において、前記第 2 段階はゲル濾過クロマトグラフィーを具える方法。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の方法において、前記クロマトグラフィーはセファロースペプチドカラムを用いる方法。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法において、発現されるヘブシジンがヒトヘブシジンである方法。

【請求項 16】

50

請求項 15 に記載の方法において、前記発現されるヘプシジンが配列番号 1 ~ 8 のアミノ酸配列からなる群より選択される方法。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の方法において、前記発現されるヘプシジンが配列番号 6 の配列を有する方法。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法によって得られるヘプシジン。

【請求項 19】

請求項 18 に記載のヘプシジンにおいて、該ヘプシジンが配列番号 6 の配列を有するヘプシジン。

10

【請求項 20】

ヘプシジンを発現させるための真核性メチロトローフ酵母（好ましくはピキアパストリス）の使用方法。

【請求項 21】

請求項 20 の使用方法において、前記ヘプシジンが配列番号 1 ~ 8 の配列からなる群より選択されるヒトヘプシジンである使用方法。

【請求項 22】

配列番号 5 ~ 8 の配列からなる群より選択される標識ヘプシジン。

【請求項 23】

請求項 21 に記載の標識ヘプシジンにおいて、該ヘプシジンが配列番号 6 であるヘプシジン。

20

【請求項 24】

請求項 21 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の標識ヘプシジンに特異的に結合する抗体。

【請求項 25】

抗体を上昇させるために請求項 21 又は 22 のいずれかに記載の標識ヘプシジンを使用する方法。

【請求項 26】

請求項 24 に記載の抗体又は請求項 25 に記載の方法において、前記抗体がモノクローナル又はポリクローナルである抗体又は方法。

【請求項 27】

抗菌物質として使用される請求項 22 又は 23 に記載のヘプシジン。

30

【請求項 28】

鉄代謝を制御するために用いられる請求項 22 又は 23 に記載のヘプシジン。

【請求項 29】

サンプル内のヘプシジンを検知するための請求項 24 又は 26 に記載の抗体の使用。

【請求項 30】

請求項 29 に記載の使用において、前記サンプルが血清サンプル、好ましくはヒト血清又は尿である使用。

【請求項 31】

請求項 29 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の使用において、検知される前記ヘプシジンが配列番号 1 又は 2 の配列を有するヒトヘプシジンである使用。

40

【請求項 32】

サンプル（好ましくはヒト血清サンプル）内のヘプシジン量を測定するための競合 E L I S A 分析における請求項 24 又は 26 に記載の抗体を使用。

【請求項 33】

請求項 32 に記載の使用において、前記抗体が、配列番号 1 又は 2 の配列を有するヒトヘプシジンのサンプル内の量を決定するために用いられる使用。

【請求項 34】

血清サンプル内のヘプシジン量を測定する方法において、

a) 抗体を含む血清サンプルと固定化されたヘプシジンとを接触させるステップであって

50

、該抗体は血清サンプル内の固定化されたヘプシジン及びヘプシジンに特異的に結合するステップ；

b) 固定化されたヘプシジンに結合している抗体量を決定するステップ；及び、

c) 測定された量と基準とを比較して血清サンプル内のヘプシジンの量を測定するステップを具える方法。

【請求項 35】

請求項 34 に記載の方法において、前記基準が：

a) ヘプシジン及び固定化されたヘプシジンの両方に特異的に結合する抗体を含む既知濃度のヘプシジンを含むサンプルと、固定化されたヘプシジンとを接触させるステップ；

b) 固定化されたヘプシジンに結合している抗体量を決定するステップ；

c) 結果を記録するステップ；

d) 前のサイクルのステップ a) において用いられた濃度とは異なる既知濃度のヘプシジンを含むさらなるサンプルを用いてステップ a) ~ c) のサイクルを繰り返すステップ；及び、

e) 適切な標準曲線が生成されるまでステップ d) を繰り返すステップ、
によって生成される阻害曲線である方法。

【請求項 36】

請求項 34 又は 35 に記載の方法において、前記固定化されたヘプシジンが配列番号 6 の配列を有する方法。

【請求項 37】

請求項 34 ~ 36 のいずれかに記載の方法において、前記基準が、配列番号 6 の配列を有する既知量のヘプシジンを含むサンプルを用いて得られる方法。

【請求項 38】

血清サンプル内のヘプシジン量を測定するために用いられる E L I S A キットにおいて：

ヘプシジン；及び、

ヘプシジン及び測定されるヘプシジンに特異的に結合する抗体、
を具えるキット。

【請求項 39】

請求項 38 に記載のキットにおいて、前記ヘプシジンが固定化されているキット。

【請求項 40】

請求項 38 又は 39 のいずれかに記載のキットであって、

前記キットがさらに複数の容器又は管を具え、

該複数の容器又は管が、それぞれ、異なる濃度のヘプシジンを含むキット。

【請求項 41】

血色素症若しくは血色素症から生じる疾患又は鉄過剰に関連する他の任意の病状の治療又は防止に用いる請求項 22 又は 23 のいずれか 1 項に記載の標識ヘプシジン。

【請求項 42】

請求項 41 に記載の標識ヘプシジンにおいて、前記疾病が、肝細胞癌、心筋症又は糖尿病からなる群より選択される標識ヘプシジン。

【請求項 43】

貧血若しくは貧血から生じる疾患又は鉄不足に関連する病状の治療又は防止に用いる請求項 22 又は 23 のいずれか 1 項に記載の標識ヘプシジンの阻害剤。

【請求項 44】

請求項 43 に記載の阻害剤において、該阻害剤が請求項 24 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の抗体である阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はペプチドホルモン、特にヘプシジンを生産する工程に関する。本発明は、特に

10

20

30

40

50

ヒトヘプシジン - 20 及び - 25 並びにそれらの標識形態を含む類似化合物を生産する工程に関する。また、本発明のヘプシジンを診断薬及び治療薬としての使用を提供する。

【0002】

鉄は、酸素運搬、細胞増殖、呼吸及びDNA合成に関与していることから、すべての生命体の必須微量元素である。しかし、遊離鉄は非常に有毒であり、酸化ストレスを促進する。哺乳動物は生理的な排出経路を有しておらず、鉄のバランスは、その吸収及び貯蔵の制御によって維持されている (Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler 及び Andrews N. C. (2004) Cell, 117, 285-97)。

【0003】

ヒトの鉄代謝の重要な制御要因の1つは、ペプチドホルモンであるヘプシジンである (Fleming, R. E. 及び Sly W. S. (2001) Proc Natl Acad. Sci. 米国, 98, 8160-2)。ヘプシジンは、システインを多く含み、主に肝臓中で発現される小さいペプチドであり (Pigeon, C, llyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brisso t, P., Loreal, O. (2001) J. Biol. Chem. 276, 7811-9)、84個のアミノ酸プレプロペプチドとして合成される。プレプロペプチドのカルボキシル末端部位に対応する成熟した生成物は、20及び25のアミノ酸の2つの優位型で循環しており、ヒトの血清及び尿中で検出可能である (Krause, A., Neitz, S., Mager t, H. J., Schulz, A., Forssmann, W. G., Schulz-Knappe, P., Adermann, K. (2000) FEBS Lett. 480, 147-50 and Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., Ganz, T. (2001) J. Biol. Chem. 276, 7806-10)。両方のアイソフォームは、8つのシステイン残基を含んでおり、抗菌性及び抗真菌活性を有するデフェンシン様ペプチドを生じさせる (Krause, A., Neitz, S., Mager t, H. J., Schulz, A., Forssmann, W. G., Schulz-Knappe, P., Adermann, K. (2000) FEBS Lett. 480, 147-50 and Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., Ganz, T. (2001) J. Biol. Chem. 276, 7806-10)。NMR構造解析により、ヘプシジンは4つのジスルフィド結合によって安定化された単純なヘアピン構造に折り重なっており、該4つのジスルフィド結合の1つは、通常みられないものであり、2つの隣接するシステインの間に形成されていることが明らかにされている (Hunter, H. N., Fulton, D. B., Ganz, T., Vogel, H. J. (2002) J. Biol. Chem. 277, 37597-603)。

【0004】

鉄代謝におけるヘプシジンの関与は、食物中の鉄によってその発現が誘導されることを示す試験によって示唆された (Pigeon, C, llyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brisso t, P., Loreal, O. (2001) J. Biol. Chem. 276, 7811-9)。さらに、ヘプシジンが欠損しているマウスは、肝臓に鉄を堆積する血色素症表現型を発現し、マクロファージを欠乏していることがわかった (Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C, Grandchamp, B., Kahn, A., Vaulong, S. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 8780-5)。一方で、ヘプシジンを過剰発現する遺伝子組み換えマウスは、重篤な鉄欠乏性貧血により誕生後数時間内の死亡率が増加した (Nicolas, G., Bennoun, M., Porteu, A., Mativet, S., Beaumont, C, Grandchamp, B., Sirito, M., Sawadogo, M., Kahn, A., Vaulont, S. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 4596-601)。唯一の既知の細胞鉄排出体であるフェロポルチン (Donovan, A., Lima, C. A., Pinkus

10

20

30

40

50

, J. L., Pinkus, G. S., Zon, L. I., Robine, S., Andrews, N. C. (2005) *Cell Metab.* 1, 191 - 200) にヘプシジンが結合すること、また、細胞質中において内在化及び分解を引き起こす (Nemeth, E., Turtle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Ganz, T., Kaplan, J. (2004) *Science* 306, 2090 - 3) ことが近年発見されたとき、ヘプシジン作用の分子機構が明らかになった。フェロポルチンは、肝細胞、マクロファージ及び腸細胞の中で発現する (Donovan, A., Lima, C. A., Pinkus, J. L., Pinkus, G. S., Zon, L. I., Robine, S., Andrews, N. C. (2005) *Cell Metab.* 1, 191 - 200)。多量のヘプシジンは、フェロポルチンの発現を減少させ、それにより、摂食による鉄吸収、マクロファージから再利用される鉄の放出、及び、肝臓からの鉄貯蔵の移行を阻害する。

10

【0005】

いくつかの研究は、鉄の恒常性の制御におけるヘプシジンの重要な役割を示した。ヘプシジンの突然変異は、若年型血色素症 (JH) の患者に関係していた (Roetto, A., Daraio, F., Porporato, P., Caruso, R., Cox, T. M., Cazzola, M., Gasparini, P., Piperno, A., Camaschella, C. (2004) *Blood* 103, 2407 - 9 and Roetto, A., Papanikolaou, G., Politou, M., Alberti, F., Girelli, D., Christakis, J., Loukopoulos, D., Camaschella, C. (2003) *Nat. Genet.* 33, 21 - 2)。さらに、HFE、TFR2又はHJV遺伝子の突然変異によって生じる他のタイプの遺伝性血色素症もまた、ヘプシジン発現の異常に関係している (Bridle, K. R., Frazer, D. M., Wilkins, S. J., Dixon, J. L., Purdie, D. M., Crawford, D. H., Subramaniam, V. N., Powell, L. W., Anderson, G. J., Ramm, G. A. (2003) *Lancet* 361, 669 - 73; Nemeth, E., Roetto, A., Garozzo, G., Ganz, T., Camaschella, C. (2005) *Blood* 105, 1803 - 6 and Babitt, J. L., Huang, F. W., Wrighting, D. M., Xia, Y., Sidis, Y., Samad, T. A., Campagna, J. A., Chung, R. T., Scheyer, A. L., Wolf, C. J., Andrews, N. C., Lin, H. Y. (2006) *Nat. Genet.* 38, 531 - 9)。

20

30

【0006】

慢性炎症性疾患において、ヘプシジンの上方制御は、慢性疾患性貧血の一因となる (Nemeth, E., Valore, E. V., Territo, M., Schiller, G., Lichtenstein, A., Ganz, T. (2003) *Blood* 101, 2461 - 3; Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Kellre, C., Taudorf, S., Pedersen, B. K., Ganz, T. (2004) *J. Clin. Invest.* 113, 1271 - 6 and Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J. L., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A., Valmont, S. (2002) *J. Clin. Invest.* 110, 1037 - 44)。

40

【0007】

その深遠な生物医学的重要性から、ヘプシジンは、集中的に生化学的研究対象とされた。しかしながら、そのような研究は、機能性ペプチドの限定された利用性により妨げられている。化学的に合成されたヘプシジンは商業的に入手可能であるが、この物質は、生物学的分析においてほとんどの場合不活性である。尿からのヘプシジンの単離は、その低い濃度により困難であると分かった。生物学的に活性なヘプシジンの大量生産のための異種系の開発は、重要なステップになるであろう。現在まで、大腸菌中で組み換えヘプシジン

50

を発現させるために、様々な種類のアプローチが用いられてきた。第1のアプローチでは、封入体中の10.5 kDaの融合タンパク質(His-ヘプシジン)として発現され、変性された形態で精製され、リフォールディングし、エンテロキナーゼによって開裂し、逆相クロマトグラフィーにより更に精製した(Zhang, H., Yuan, Q., Zhu, Y., Ma, R., (2005) *Protein Expr. Purif.* 41, 409-16)。このペプチドは抗菌活性を示した。第2のアプローチにおいては、GST若しくはマウスのHフェリチンのC末端に対する融合タンパクとして、又は、フェリチンの螺旋Dと螺旋Eとの間のループの真中にそれを挿入することによりヘプシジン-20を複製した(Gerardi, G., Biasiotto, G., Santambrogio, P., Zanella, I., Ingrassia, R., Corrado, M. C. 10
Cavadini, P., Derosas, M., Levi, S., Arosio, P. (2005) *Blood Cells MoI. Dis.* 35, 177-81)。これらのキメラタンパクは、鉄と共に分離され、ヘプシジンの生物学的機能を再現しなかった。最後のアプローチでは、Myc-His-標識ヒトヘプシジンが、HEK-293細胞中で発現された。組み換えペプチドは、処理され、正確に分泌され、抗菌分析において生物学的に活性であった(Wallace, D. F., Jones, M. D., Pedersen, P., Rivas, L., Sly, L. I., Subramaniam, V. N. (2006) *Biochimie* 88, 31-7)。しかし、鉄代謝の制御における上述の組み換え生成物の機能的分析については何ら記載されていない。

【0008】

鉄の恒常性におけるヘプシジンの重要な役割及び鉄欠乏症の病因に基づいて、血液又は尿中の測定用の簡便な分析は、血色素症又は慢性疾患性貧血の患者の診断に非常に有用であることは明らかであろう。現在、尿ヘプシジンの濃度は免疫ドット分析法を用いて測定されている(Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B. K., Ganz, T. (2004) *J. Cim Invest* 113, 1271-6), SDS-PAGE and Western Blot (Nemeth, E., Valore, E. V., Territo, M., Schiller, G., Lichtenstein, A., Ganz, T. (2003) *Blood* 101, 2461-3), or a SELDI-TOF-MS (Kemna, E., Tjalsma, H., Laarakkers, C., Nemeth, E., Williams, H., and Swinkels, D. (2005) *Blood* 106, 3268-3270)。最近、2つの報告において、ヒト血漿及び血清中のヘプシジン濃度を測定するためのSELDITOF-MSの使用が記載されている(Tomosugi, N., Kawabata, H., Wakatabe, R., Higuchi, M., Yamaya, H., Umehera, H., Ishikawa, I. (2006) *Blood* 108, 1381-7 and Kemna, E., Tjalsma, H., Podust, V., and Swinkels, D. (2007) *Cim Chem* 53, 1-9)。一方で、別の報告によれば、ヒト及びマウスの血清中の活性ヘプシジンは、通常のヒトヘプシジンについて1~500 ng/mLの血清の量的範囲でLC/MS/MSを用いて測定された(Murphy, A. T., Witcher, D. R., Luan, P., and Wroblewski, V. J. (2007) *Blood* 110, 1048-54)。

【0009】

研究目的用のこれらの方法の利用にもかかわらず、質量分析法の先進技術は、臨床的用途において幅広く利用し易いものではない。これまでに記載された唯一の免疫学的検定方法は、プロヘプシジン(84個のアミノ酸の活性ヘプシジンペプチド前駆体)を測定するものであり、血清ヘプシジン濃度がプロヘプシジン測定濃度に直接的に相関するという仮定に基づいている(Hadley, K. B., Johnson, L. K., and Hunt, J. R. (2006) *AM J Clin Nutr.* 84, 150-155)。しかしながら、プロヘプシジンELISAを用いた別の研究によれば、血清プロヘプシジンレベ

10

20

30

40

50

ルは、LPS注入後の尿ヘプシジンレベルと相関しておらず、そのことが、診断のためのプロヘプシジン測定の利用を疑わしいものになっている (Kemna, E., Pickkers, P., Nemeth, E., van der Hoeven, H., and Swinkels, D (2005) Blood 106, 1864 - 1866)。

【0010】

上記観点から、先端研究又は臨床的用途のために十分な量で機能的組み換えヘプシジンを生産することができる工程を提供する必要性、及び/又は、生体試料中で(すなわち診断目的のために)ヘプシジンの量を測定することができる信頼性のある分析法を提供する必要性があることは明らかである。

【0011】

そのような工程及び/又は分析法を提供することが本発明の目的である。

【0012】

本発明の第1の態様において、生物学的機能性ヘプシジン又は生物学的機能性ヘプシジン誘導体を生産する方法であって、真核性メチロトローフ酵母(好ましくはピキアパストリス)であるという点で特徴づけられる発現系内において、ヘプシジン又はヘプシジン誘導体を外因的に発現させるステップを具える方法を提供する。

【0013】

本発明の第2の態様において、生物学的機能性ヘプシジン又は生物学的機能性ヘプシジン誘導体を生産する方法であって、該方法は発現系内においてヘプシジン又はヘプシジン誘導体を発現させるステップを具え、前記ヘプシジンがC末端に少なくとも1つの標識を有するように与えられる方法を提供する。

【0014】

実験プロトコル及び添付された図面を参照してわかるように、本発明者らは、初めて、生物学的機能性組み換えヘプシジン又は生物学的機能性組み換えヘプシジン誘導体の成功した異種性発現を提供した。生物学的機能により、ヘプシジン及びヘプシジン誘導体のいずれもが殺菌性を有し、細胞の鉄代謝をコントロールする能力を有することが理解される。以前の組み換えヘプシジンを生産する試みと比較して、本方法又は本工程は、いかなる還元工程をも必要とせず、可溶性発現及び高収率という長所を有することが理解されるだろう (Zhang, H., Yuan, Q., Zhu, Y., Ma, R., (2005) Protein Expr. Purif. 41, 409 - 16 and Wallace, D. F., Jones, M. D., Pedersen, P., Rivas, L., Sly, L. I., Subramaniam, V. N. (2006) Biochimie 88, 31 - 7)。より重要なことに、結果として生じるヘプシジン及び誘導体は、抗菌性ペプチドとしてのみでなく又は主として、細胞の鉄代謝を制御するものとして機能的であり、すなわち、それらは生物学的に機能性である。

【0015】

ここで使用されているように、「ヘプシジン」という用語又は「Hep」という略語は、別段の定めがない限り、ヒトヘプシジン - 20及びヘプシジン - 25の両方、すなわち、それぞれ20個及び25個の成熟優勢型アミノ酸残基長のヒトホルモンヘプシジン、又は、ヘプシジン誘導体を包含する。この点で、ヒトヘプシジン - 20は、Hep20と称され、配列番号のアミノ酸配列の配列番号1を有し、ヒトヘプシジン - 25は、Hep25と称され、アミノ酸配列の配列番号2のアミノ酸配列を有する。ここで使用されているように、「誘導体」という用語は、別段の定めがない限り、ヒトヘプシジン - 20及びヘプシジン - 25の20個及び25個のアミノ酸残基の両方であって、N末端に位置する1以上の付加アミノ酸を有するものを包含する。また、「ヘプシジン」という用語、「Hep」という略語又は「誘導体」は、別段の定めがない限り、ヒトHep - 20及びヒトHep - 25を包含するヒトヘプシジンに限定されないことは理解されるであろう。

【0016】

誘導体は、好ましくは、N末端に位置する2個の付加アミノ酸を有するヘプシジン - 20又はヘプシジン - 25である。好ましい実施形態において、誘導体は、付加アミノ酸で

10

20

30

40

50

あるグリシン及びアラニンをN末端に有するヘブシジン - 20であり；この誘導体は、本明細書中でヘブシジン - 20dと称され、配列番号3のアミノ酸配列を有している。さらに好ましい実施形態において、誘導体は、付加アミノ酸であるグリシン及びアラニンをN末端に有するヘブシジン - 25であり；この誘導体は、本明細書においてヘブシジン - 25dと称され、配列番号4のアミノ酸配列を有している。

【0017】

標識は、好ましくは、ポリヒスチジン標識である。理解されるように、ポリヒスチジン標識は、少なくとも6つのヒスチジン(His)からなる特徴的なアミノ酸の配列である。また、ポリヒスチジン標識は、ヘキサヒスチジン標識、6xHis-標識、及び、登録商標名であるHis-tag(登録商標)として知られている。「His」という略語は、別段の定めがない限り、使用されるすべての箇所において、ポリヒスチジン標識を意味することは理解されるであろう。

10

【0018】

標識は、さらに好ましくは、myc-His-標識である。上述したように、「His」という呼称は、別段の定めがない限り、ポリヒスチジン標識を意味する。「myc」という呼称は、c-mycエピトープである。

【0019】

標識は、直接的又は間接的にヘブシジン又はヘブシジン誘導体のC末端に提供されていてもよいことが理解されるであろう。直接的に提供する場合は、標識は、ヘブシジン - 20、ヘブシジン - 25又はヘブシジン誘導体の末端のアミノ酸に連続して位置する。標識は、リンカーを介して間接的に位置してもよい。

20

【0020】

好ましくは、リンカーは、ヘブシジン - 20、ヘブシジン - 25又はヘブシジン誘導体の末端のアミノ酸に連続して位置する1個以上のアミノ酸である。より好ましくは、リンカーは、2個のアミノ酸の長さであり、さらに好ましくは、アミノ酸は、フェニルアラニンとアスパラギン酸との組み合わせである。

【0021】

代替的に、リンカーは、ヘブシジン - 20、ヘブシジン - 25又はヘブシジン誘導体の末端の1個以上のアミノ酸がアミノ酸で置換されたものである。より好ましくは、リンカーは、ヘブシジン - 20、ヘブシジン - 25又はヘブシジン誘導体の末端アミノ酸が1個のアミノ酸で置換されたものであり、さらに好ましくは、末端アミノ酸であるトレオニンがロイシンで置換されたものである。

30

【0022】

好ましくは、His-標識は、ヘブシジン - 20又はヘブシジン - 25に、フェニルアラニンとアスパラギン酸とからなるリンカーを用いて提供される。さらに好ましくは、myc-His-標識は、ヘブシジン - 20又はヘブシジン - 25に、末端アミノ酸であるトレオニンを置換したロイシンのリンカーを用いて提供される。

【0023】

好ましい実施形態において、His-標識は、末端アミノ酸であるトレオニンを置換したロイシンのリンカーにより、N末端に位置するグリシン及びアラニンを有するヘブシジン - 20誘導体に提供される。この生物学的機能性標識ヘブシジン誘導体は、ここにおいてヘブシジン - 20His(Hep-20His)と称され、配列番号5のアミノ酸配列を有する。

40

【0024】

さらに好ましい実施形態において、His-標識は、フェニルアラニンとアスパラギン酸とからなるリンカーにより、N末端に位置するグリシン及びアラニンを有するヘブシジン - 25誘導体に提供される。この生物学的機能性標識ヘブシジン誘導体は、ヘブシジン - 25His(Hep-25His)と称され、配列番号6のアミノ酸配列を有する。

【0025】

さらに好ましい実施形態において、myc-His標識は、末端のアミノ酸であるトレ

50

オニンを置換したロイシンのリンカーにより、N末端に位置するグリシン及びアラニンを有するヘプシジン - 20 誘導体に提供される。この生物学的機能性標識ヘプシジン誘導体は、ヘプシジン - 20 M y c H i s (H e p - 20 M y c H i s) と称され、配列番号7のアミノ酸配列を有する。

【0026】

さらに好ましい実施形態において、m y c - H i s - 標識は、末端のアミノ酸トレオニンを置換したロイシンのリンカーにより、N末端に位置するグリシン及びアラニンを有するヘプシジン - 25 誘導体に対して提供される。この生物学的機能性標識ヘプシジン誘導体は、ヘプシジン - 25 M y c H i s (H e p - 25 M y c H i s) と称され、配列番号8のアミノ酸配列を有する。

10

【0027】

好ましくは、生物学的機能性標識ヘプシジン又は生物学的機能性標識ヘプシジン誘導体は、発現系内において外因的に発現され、該発現系は、真核性メチロトローフ酵母（好ましくはピキアパストリス）である。以下に与えられる結果を参照すると、真核性メチロトローフ酵母であるピキアパストリス発現系は、細胞外可溶タンパク、真核性翻訳後修飾（ジスルフィド結合成形など）を生産する能力により、特に有利であることは理解されるであろう。また、その発現系は、取扱が容易であり、生産において高収率である。

【0028】

本発明の方法は、好ましくは、ヘプシジン又はヘプシジン誘導体の発現に先立って、発現系（好ましくは真核性メチロトローフ酵母発現系、より好ましくはピキアパストリス）の中にヘプシジンをコードするポリヌクレオチド挿入物を含むベクターを導入するステップを具える。

20

【0029】

ここで使用されているように、ヘプシジンをコードするポリヌクレオチド挿入物は、それぞれ配列番号1及び2の配列を有するヒトヘプシジン - 20 及び - 25 (ヒト H e p 20 及び H e p 25) を含むヘプシジン、又は、それぞれ配列番号3及び4の配列を有するヘプシジン - 20 d 及びヘプシジン - 25 d を含むヘプシジン誘導体をコードすることができるポリヌクレオチドであることは理解されるであろう。また、ヘプシジンをコードするポリヌクレオチド挿入物は、好ましい標識（すなわち、M y c 及び 6 x H i s ）を有する標識ヘプシジン又は標識ヘプシジン誘導体、並びに / 又は、配列番号5の配列を有するヘプシジン - 20 H i s 、配列番号6の配列を有するヘプシジン - 25 H i s 、配列番号7の配列を有するヘプシジン - 20 M y c H i s 、及び、配列番号8の配列を有するヘプシジン - 25 M y c H i s を含むリンカー（すなわち、フェニルアラニンとアスパラギン酸又はロイシン）でヘプシジン - 20 及び - 25 の末端アミノ酸が置換されたものをコードすることができるポリヌクレオチドを含む。

30

【0030】

当業者は、ベクターが任意の適切なベクターであってもよいことを理解するであろう。ベクターは、例えば、p P I C Z a A 、 p P I C Z a B 又は p P I C Z a C (I n v i t r o g e n 社、カールズバッド、カリフォルニア) であってもよい。ベクターは、好ましい標識（すなわち M y c 及び 6 x H i s ）、及び / 又は、リンカー（すなわち、フェニルアラニンとアスパラギン酸、又は、ロイシンのみからなるアミノ酸）でヘプシジン - 20 及び - 25 の末端アミノ酸が置換されたものをコードすることができる。

40

【0031】

ヘプシジンをコードするポリヌクレオチド挿入物は、好ましくは、F o k I 制限部位を有するように提供される。該挿入物の F o k I 制限特異的的部位は、ベクターから制限部位と組み合わされて、H e p - 25 M y c H i s 、 H e p - 20 M y c H i s 、 H e p - 25 H i s 及び H e p - 20 H i s プラスミドであって、該プラスミドは H i s - エピトープのみと又は c - M y c H i s に融合したヘプシジン - 25 及びヘプシジン - 20 並びにヘプシジン誘導体の発現を許容するものの構築を可能にする。

【0032】

50

ヘプシジンをコードするポリヌクレオチド挿入物は、好ましくは、ヒトヘプシジン - 25 d をコードする。また、前記方法は、ここにおいて For Hep 25 及び Rev Hep と称される重複オリゴヌクレオチドの伸長によって得られる生成物の PCR 増幅によってヘプシジン - 25 d をコードする挿入物を得るステップを具える。それらの配列は、図 1 に示されている。PCR 増幅は、さらに好ましくは、ここにおいて For Xhol 及び Rev Not 1 と称されるプライマーを用いて行なわれる。それらの配列は、図 1 に示されている。

【0033】

ヘプシジンをコードするポリヌクレオチド挿入物は、ヒトヘプシジン - 20 d をコードすることが好ましい。また、前記方法は、好ましくは、ここにおいて For hep 20 (5 - G C G A G T G C A T C G A C G G C G C C A T A T G C A T C T T C T G C T G - S) と称されるプライマー、及び、図 1 に配列が示されている Rev Not 1 を用いて、得られるベクターの PCR 増幅を実行するステップを具える。

10

【0034】

本発明の方法は、好ましくは、発現されたヘプシジンを精製するステップをさらに具える。好ましい実施形態において、精製ステップは 2 段階の精製工程を具える。精製工程の第 1 段階は、好ましくは、金属親和性クロマトグラフィーを含む。前記金属は、好ましくは、ニッケル、コバルト、NTA で配位されたニッケル (ニトリロ三酢酸) である。好ましい実施形態において、精製工程の第 2 段階は、ゲル濾過クロマトグラフィーを含む。好ましくは、セファロース又はスーパーデックス (商標) ペプチドカラムを用いる。

20

【0035】

発現されたヘプシジンは、さらに好ましくはヒトヘプシジンであり、配列番号 1 の配列を有するヘプシジン - 20、配列番号 2 の配列を有するヘプシジン - 25、配列番号 3 の配列を有するヘプシジン - 20 d、配列番号 4 の配列を有するヘプシジン - 25 d、配列番号 5 の配列を有するヘプシジン - 20 His、配列番号 6 の配列を有するヘプシジン - 25 His、配列番号 7 の配列を有するヘプシジン - 20 Myc His、及び、配列番号 8 の配列を有するヘプシジン - 25 Myc His からなる群より好適に選択される。

【0036】

本発明のさらなる態様において、本発明の方法を実行することにより入手可能なヘプシジンを提供する。

30

【0037】

ヘプシジンは、好ましくは、配列番号 6 の配列を有するヒトヘプシジン - 25 His である。下記実験プロトコルに準拠して、ヒトヘプシジン - 25 His (Hep - 25 His) が最も機能性であることは明らかであった。それは、E. coli 株 ML35 に対する最大の殺菌力を示し、尿から単離された天然ヘプシジン - 25 又は合成ヘプシジンに非常に似ていた。Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., Ganz, T. (2001) J. Biol. Chem. 276, 7806 - 10 によれば、hep 25 及び hep 20 のいずれもが 30 μ M の濃度において生存するバクテリア ML35 p を 1000 倍の減少を達成した。また、Hep - 25 His は、生存するバクテリアの数を 30 μ M で 1000 倍減少させた。更に、Hep - 25 His ペプチドもまた、標的 RAW 264.7 マクロファージにおいて、フェロポルチンレベルを 50% まで減少させることができた。この効果は、明らかに輸送体フェロポルチン (FPN1) の内在化及び分解のためであった。この作用機構は、安定した細胞系 HEK 293 - Fpn において試験され、組み換えペプチド Hep 25 - His を用いた処理は、合成ヘプシジンとの類似性により、FPN1 - GFP の内在化を生じさせることを示した (Nemetz, E., Turtle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Ganz, T., Kaplan, J. (2004) Science 306, 2090 - 3)。Hep - 25 His で媒介されて TFR1 発現が 50% まで付随的に減少することは、鉄分子を搬出する分子を比較的少なく発現する細胞内において予想される鉄蓄積に対する恒常的反応と一致している。Hep - 2

40

50

5 His - で処理された RAW 264.7 マクロファージ内の鉄の保持率は、LIP レベルの増加によって実証される。ピキアパストリスの中でベクターのみで生産され、Myc - His - 標識を有する、4.8 kDa の陰性ペプチドを用いたデータは、この反応の特異性を示す。さらに、架橋及びプルダウンアッセイにより、組み換えペプチドが受容体 (フェロポルチン) に特異的に結合できることを実証する。

【0038】

以下の結果によって、配列番号6の配列を有する Hep - 25 His は、ヘプシジン - 25 の非常に良い類似化合物であり、挙動がよく似ていることが明確である。それは、発酵規模が大きくなるにつれてさらに増大した量で発現される。組み換えヘプシジンを生産するための以前の試みと比較して、この系には、いかなる還元処理をも必要とせず、高収率な可溶性発現を提供するという長所がある (Zhang, H., Yuan, Q., Zhu, Y., Ma, R., (2005) Protein Expr. Purif. 41, 409-16 and Wallace, D.F., G, H., M.D., Pedersen, P., Rivas, L., Sly, L.I., Subramaniam, V.N. (2006) Biochimie 88, 31-7)。ピキアパストリスにおいて発現される配列番号6の配列を有する組み換え Hep - 25 His は、抗菌性ペプチドとしてだけでなく、細胞の鉄代謝のレギュレーターとしても機能性であることをより重要なこととして報告する。

10

【0039】

本発明の別の態様において、For Hep 20、For Hep 25、Rev Hep、For Xhol 及び Rev Not 1 からなる群より選択されるプライマーのいずれか1つの使用を提供する。これらの配列は、図1に示されており、ポリヌクレオチドをコードするヘプシジンを増幅させるために、好ましくは、配列番号1の配列を有するヒトヘプシジン - 20、配列番号2の配列を有するヘプシジン - 25、配列番号3の配列を有するヘプシジン - 20d、及び、配列番号4の配列を有するヘプシジン - 25d をコードするポリヌクレオチドである。

20

【0040】

また、ヘプシジン (好ましくは、配列番号1の配列を有するヘプシジン - 20、配列番号2の配列を有するヘプシジン - 25、配列番号3の配列を有するヘプシジン - 20d、配列番号4の配列を有するヘプシジン - 25d、配列番号5の配列を有するヘプシジン - 20 His、配列番号6の配列を有するヘプシジン - 25 His、配列番号7の配列を有するヘプシジン - 20 Myc His、及び、配列番号8の配列を有するヘプシジン - 25 Myc His を含むヒトヘプシジン) を発現させるために、真核性メチロトローフ酵母 (好ましくはピキアパストリス) 使用をする方法を提供する。

30

【0041】

本発明のある別の態様において、標識ヘプシジン (好ましくは、配列番号5の配列を有するヘプシジン - 20 His、配列番号6の配列を有するヘプシジン - 25 His、配列番号7の配列を有するヘプシジン - 20 Myc His、及び、配列番号8の配列を有するヘプシジン - 25 Myc His からなる群より選択されるヒトヘプシジン) を提供する。ヘプシジンは、好ましくは、配列番号6の配列を有するヒトヘプシジン - 25 His である。

40

【0042】

本発明のさらなる態様において、本発明の標識ヘプシジン又は標識ヘプシジン誘導体に特異的に結合する抗体を提供する。「特異的に結合する」とは、2つの分子間の特有で正確な相互作用であって、該2つの分子構造に依存する相互作用を指す。

【0043】

また、抗体、好ましくはモノクローナル又はポリクローナル抗体を上昇させるに本発明の標識ヘプシジン又は標識ヘプシジン誘導体を使用する方法を提供する。抗体は、好ましくは、ヒトヘプシジン - 25 His を用いてウサギに免疫を付与することにより得られるポリクローナル抗体である。本発明の方法に適する抗体又はその断片には、キメラ抗体、

50

ヒト化抗体、一本鎖抗体、F a b断片、F c断片、抗体ペプチド融合タンパク、並びに、軽鎖及び重鎖の単量体若しくは二量体又はこれらの混合物が含まれる。

【0044】

本発明のさらなる態様において、抗菌物質としての用途を含む治療用途のための本発明のヘプシジン又はヘプシジン誘導体を提供する。

【0045】

本発明のさらなる態様において、鉄代謝をコントロールにおける用途のための本発明のヘプシジン又はヘプシジン誘導体を提供する。ヘプシジン又はヘプシジン誘導体は、鉄の吸収を阻害する。また、鉄代謝のコントロールに用いる本発明のヘプシジン又はヘプシジン誘導体の阻害剤を使用する方法を提供する。前記阻害剤は鉄吸収を増加させる。

10

【0046】

また、サンプル内のヘプシジン又はヘプシジン誘導体レベルを検知する本発明の抗体の使用手法を提供する。好ましい実施形態において、サンプルは血清サンプルであり、好ましくはヒト血清又は尿である。検知されるヘプシジンは、好ましくは、サンプル内のヒトヘプシジン - 20 d又は - 25 dである。

【0047】

本発明の別の態様において、サンプル（好ましくは、ヒト血清サンプル）内のヘプシジン又はヘプシジン誘導体の量を決定するためにE L I S A競合試験に本発明の抗体を使用する方法を提供する。好ましくは、この抗体を用いてサンプル内のヒトヘプシジン - 20 d又は - 25 dの量を測定する。

20

【0048】

本発明のさらなる態様において、血清サンプル内のヘプシジンの量を測定する方法であって、該方法は、以下のステップ：

- a) 血清サンプル内の固定化されたヘプシジン及びヘプシジンに特異的に結合する抗体を含む血清サンプルと固定化されたヘプシジンとを接触させるステップ；
 - b) 固定化されたヘプシジンに結合した抗体の量を測定するステップ；及び、
 - c) 測定量と標準とを比較することによって、血清サンプル内のヘプシジンの量を測定するステップと、
- を具える方法を提供する。

【0049】

本発明の分析法、すなわち、ヘプシジン測定のエリザ法は、サンプル予備処理を不要にし、単純であり、高速であり、高度に再現可能であり、特異的であり、すべての臨床及び研究室において広く適用できることを含めたいくつかの長所を有している。鉄に関連する疾病のタンパク指標として、臨床及び研究室において日常的にヘプシジンを測定することを可能とし、さらに、それらの進行の迅速な診断及びモニタリングに寄与する。

30

【0050】

好ましい実施形態において、標準は、以下のステップ：

- a) ヘプシジンと固定化されたヘプシジンとに特異的に結合する抗体を含む既知濃度のヘプシジンを含むサンプルと、固定化されたヘプシジンとを接触させるステップ；
 - b) 固定化されたヘプシジンに結合した抗体の量を測定するステップ；
 - c) 結果を記録するステップ；
 - d) 前のサイクルのステップ a) において用いられた濃度とは異なる既知の濃度のヘプシジンを含むさらなるサンプルを用いてステップ a) ~ c) のサイクルを繰り返すステップ；及び、
 - e) 適切な標準曲線が生成されるまでステップ d) を繰り返すステップ、
- により生成される阻害曲線である。

40

【0051】

固定化ヘプシジンは、配列番号1の配列を有するヘプシジン - 20、配列番号2の配列を有するヘプシジン - 25、配列番号3の配列を有するヘプシジン - 20 d、配列番号4の配列を有するヘプシジン - 25 d、配列番号5の配列を有するヘプシジン - 20 H i s

50

、配列番号6の配列を有するヘプシジン - 25 His、配列番号7の配列を有するヘプシジン - 20 Myc His、及び、配列番号8の配列を有するヘプシジン - 25 Myc Hisであってもよいことは理解されるであろう。固定化ヘプシジンは、好ましくは、配列番号6の配列を有するヘプシジン - 25 Hisである。

【0052】

前記標準は、好ましくは、配列番号6の配列を有する既知量のヘプシジン - 25 Hisを含むサンプルを用いて得られる。

【0053】

本発明のさらなる態様において、ヘプシジンを含む血清サンプル内のヘプシジンの量を測定するために用いられるELISAキット、並びに、ヘプシジン及び測定するヘプシジンに特異的に結合する抗体を提供する。ヘプシジンは固定化されていることが好ましい。前記キットは、好ましくは、さらに、互いに異なる様々な濃度でヘプシジンを含む複数の容器又は管を具えている。

10

【0054】

また、血色素症若しくは血色素症から生じる疾患又は鉄過剰に関連する他の病状を治療又は防止する用途のために本発明の標識ヘプシジンを使用する方法を提供する。前記血色素症から生じる疾患は、肝細胞癌、心筋症又は糖尿病からなる群より選択されうる。標識ヘプシジン及び標識ヘプシジン誘導体は、鉄吸収を阻害することにより鉄代謝を制御する。

【0055】

また、貧血若しくはそこから結果として生じる疾患又は鉄不足に関連する病状を治療又は防止する用途に本発明の標識ヘプシジンの阻害剤を使用する方法を提供する。好ましい実施形態において、この阻害剤は、本発明の抗体である。阻害剤は、鉄吸収を増加させるか又は高いレベルのヘプシジンを失活させることにより鉄代謝を制御する。

20

【0056】

本発明の標識ヘプシジンは、配列番号5の配列を有するヘプシジン20 His、配列番号6の配列を有するヘプシジン - 25 His、配列番号7の配列を有するヘプシジン - 20 Myc His、及び、配列番号8の配列を有するヘプシジン - 25 Myc Hisを含むことが理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

30

【0057】

以下において本発明者らが実行した限定的でない下記実験プロトコルと共に下記図面を参照して本発明を例示する。

【図1】図1．ピキアパストリスのベクター pPicZac における Hep25 及び Hep20 のクローニング処理 伸長に用いた長い重複するオリゴヌクレオチド (For Hep25 及び Rev Hep) を太字イタリックで示す。Hep25 の PCR 用の短いプライマー (For Xho、Rev Not1) 及び Hep20 の PCR に用いられた For Hep20 を長い矢印で示す。構築された標識ペプチドのために用いられた FokI 部位だけでなく、pPicZac ベクター内にヘプシジン PCR 生成物を複製するために用いた XhoI 及び Not1 制限部位を記載した。付加的にテトラペプチドを含む分泌タンパクを結果として生じさせる STE13 プロテアーゼの無効化が従来の研究において観察されたので、Kex2 切断部位をヘプシジンの DNA 塩基配列よりも前方に位置させた。

40

【図2】図2．Ni-NTA クロマトグラフィー後における精製された標識ヘプシジンの分析 Nu-PAGE 4-12% ゲルを用いた変性させない条件下での Ni-NTA 精製後の標識ヘプシジンの電気泳動の後、クマシーブルー染色 A 及び抗 His-mAb B を用いたウェスタンブロットを行い、予想したよりも高い分子量を有し、おそらくオリゴマーに対応するバンドが検出された。ペプチドの単量体形態を矢印で示す。M: SeeBlue 予備染色マーカー (Invitrogen)、2: Hep-25 His (配列番号6の配列を有する。)、3: Hep-25 Myc His (配列番号8の配列を有する。)、4: Hep-20 Myc His (配列番号7の配列を有する。)

50

【図3】図3．スーパーデックスペプチドカラムを用いたHep25-Hisのサイズ排除クロマトグラフィー。ペプチドスーパーデックスカラムを用いたFPLC-AKTAシステム(Amersham Bioscience社製)により、Ni-NTA精製されたHep-25His(配列番号6の配列を有する。)のサイズ排除クロマトグラフィーをおこなった。215nmの吸収において、第1ピーク(**)は、Ni-NTA精製されたペプチドのオリゴマーに対応し、また、第2ピーク(*)は、モノマー画分に対応する。

【図4】図4．サイズ排除クロマトグラフィー後の精製された標識ヘブシジン単量体の分析。精製された標識ヘブシジンをクマシーブルー染色を後に伴って、変性させない条件下でNu-PAGE4-12%ゲルを用いて分析した。M: SeeBlue予備染色マーカー(Invitrogen)、1: 合成ヘブシジン(Peptides International社製)、2: 配列番号6の配列を有するHep-25His(4kDa)、3: 配列番号8の配列を有するHep-25MyHis(4.8kDa)、4: 配列番号7の配列を有するHep-20MyHis(5.2kDa)最終的に精製された組み換えヘブシジンは、予想される分子量を有する単量体のように泳動する。

【図5】図5．組み換え標識ヘブシジンの抗菌活性。配列番号2の配列を有する合成ヘブシジン25(s.Hep25)、配列番号6の配列を有するHep-25His、配列番号8の配列を有するHep-25MyHis、配列番号7の配列を有するHep-20MyHis、及び、配列番号9の配列を有する陰性ペプチドの抗菌活性を決定するために、記載されている濃度、37、2時間において大腸菌ML35株をCFU分析に供した。リン酸ナトリウム緩衝液をネガティブコントロールとして用いた。

【図6】図6．組み換え標識ヘブシジンは、RAW264.7マクロファージ中の不安定鉄貯蔵(Labile Iron Pool、LIP)を増加させる。配列番号6の配列を有する10μMのHep-25His、配列番号8の配列を有する10μMのHep-25MyHis、配列番号7の配列を有する10μMのHep-20MyHis、及び、配列番号9の配列を有する10μMの陰性のペプチドを用いてRAW264.7マクロファージを37で4時間処理した。PBSをネガティブコントロールとして用い、30μg/mlのFACをポジティブコントロールとして用いた。イソニコチノイル-ヒドラクソンサルチルアルデヒドを添加して、LIPの相対的な変化をカルセインを用いてモニターした。データは、3回おこなった2つの独立した実験の平均±標準偏差により、コントロールと対比して表す。 ** p < 0.001、* p < 0.05 t検定を用いて統計分析をおこなった。

【図7】図7．組み換え標識ヘブシジンは、RAW264.7マクロファージ中のフェロポルチン及びTfR1を減少させるように下方制御する。A RAW264.7マクロファージを1μM及び10μMの合成ヘブシジン-25(配列番号2の配列を有する。)、Hep-25His(配列番号6の配列を有する。)、又は、ネガティブコントロールとしてPBSを用いて37で4時間処理した。細胞溶解物を、8%のSDS-PAGE、並びに、TfR1、フェロポルチン、及び、ローディングコントロールとしてアクチンに対する抗体を用いたウェスタンブロットに供した。B 2つの独立した実験に由来するフェロポルチンのバンド、TfR1のバンド、及び、アクチンタンパクのバンドの信号密度をデンストメトリにより定量し、また、これらのアクチンに対する相対強度を算出した。データは、各実験条件について、TfR1の比率の平均値、又は、アクチンレベル±標準偏差に対する平均値として示す。 * p < 0.01 t検定を用いて統計分析をおこなった。C Hep25-HisはFPN1に特異的に結合する。Hep25-His、陰性ペプチド及びPBSをRaw264.7マクロファージと共に培養し、その後、DSSを用いて架橋させた。細胞溶解物をNi2-NTAと共に培養し、溶出液を抗FPN1Abを用いたウェスタンブロットにより分析した。D Hep25-HisはFPN1-GFPの内在化を引き起こす。HEK293-Fpn細胞を、ボナスステロンを用いて24時間誘導し、その後、Hep25-His又は合成ヘブシジン25(s.Hep25)を用いて3時間処理した。Leica TCS共焦点顕微鏡を用いて蛍光を視覚化した

10

20

30

40

50

。

【図 8】図 8 . ヘブシジン - 25 に対するポリクローナル血清の特異性。 ポリクローナル血清を、配列番号 6 の配列を有する Hep - 25 His、6 x His (c o v a n c e 社製)、及び、ネガティブコントロールとしての BSA に結合するかについて、各精製ステップ前後に E L I S A により評価した。重複して行った実験の平均値 ± 標準偏差としてデータを表す。

【図 9】図 9 . 肝組織切片のヘブシジン 25 - H i s (a - H e p 2 5) に対するポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的染色。 第 2 の抗ウサギ抗体をネガティブコントロール (陰性) として用いた。ポリクローナル抗体の特異性は、ヘブシジン 25 - H i s を用いた予備培養の後に続く信号の遮断後に確認された。

【図 10】図 10 . 可溶性組み換え Hep 25 - H i s の濃度上昇を用いた阻害 E L I S A の標準曲線。 Hep 25 に対するポリクローナル抗血清を 3 % B S A を含む P B S で 1 : 3 0 0 0 に希釈し、様々な量 (0 . 0 0 5 ~ 0 . 5 n g / m l) の配列番号 6 の配列を有する Hep - 25 H i s と共に溶液で 4 で予備培養した。翌日、複合体を Hep - 25 H i s でコーティングした穴に入れ、競合させるために 37 で 1 時間放置した。濃度に依存した抗血清結合の阻害が観察された。すべてのサンプルを 4 回反復して評価した。

【図 11】図 11 . 健康な対照 (コントロール) 及び若年性血色素症 (J H) 患者におけるヘブシジン血清中濃度。ボックスプロットは、各グループについて、メジアン値の百分順位第 25 番目及び第 75 番目を示している。また、最小値及び最大値が図示されている。コントロールと比較した差は、非パラメーター性マンホイットニー検定 (S P S S 16 . 0 ソフトウェア) により有意である。

【図 12】図 12 は、ヘブシジン - 20 (配列番号 1)、ヘブシジン - 25 (配列番号 2)、ヘブシジン誘導体であるヘブシジン - 20 d (配列番号 3)、ヘブシジン - 25 d (配列番号 4)、並びに、標識ヘブシジン誘導体であるヘブシジン - 20 H i s (配列番号 5)、ヘブシジン - 25 H i s (配列番号 6)、ヘブシジン - 20 M y c H i s (配列番号 7)、ヘブシジン - 25 M y c H i s (配列番号 8)、及び、陰性ペプチド (配列番号 2) : 配列番号 1 I C I F C C G C C H R S K C G M C C K T 配列番号 2 D T H F P I C I F C C G C C H R S K C G M C C K T 配列番号 3 G A I C I F C C G C C H R S K C G M C C K T 配列番号 4 G A D T H F P I C I F C C G C C H R S K C G M C C K T 配列番号 5 G A I C I F C C G C C H R S K C G M C C K T F D H H H H H H 配列番号 6 G A D T H F P I C I F C C G C C H R S K C G M C C K T F D H H H H H H 配列番号 7 G A I C I F C C G C C H R S K C G M C C K L E Q K L I S E E D L N S A V D H H H H H H 配列番号 8 G A D T H F P I C I F C C G C C H R S K C G M C C K L E Q K L I S E E D L N A V D H H H H H H 配列番号 9 S M N S R G P A G R L G S V P R A A A A A S F L E Q K L I S E E D L N S A V D H H H H H H のアミノ酸配列を列挙する。

【 0 0 5 8 】
実験手順

非標識ヘブシジン及び標識ヘブシジンの発現のためのプラスミド構築 - 特異的プライマーを用いて、78 及び 80 の塩基長の 2 つの重複するオリゴヌクレオチドの伸長、及び、その後の P C R 増幅により、ヘブシジン - 25 (75 b p) を合成的に構築した。

【 0 0 5 9 】

図 1 は、重複するオリゴヌクレオチド F o r H e p 2 5 の配列を示しており、該配列は、信号配列の K E X 2 切断部位と共に X h o l 部位を含んでおり、さらに、N o t 1 部位及び停止コドンを含む R e v H e p 1 o n g を含んでいた。

【 0 0 6 0 】

重複するオリゴヌクレオチドの伸長後に、F o r X h o l 及び R e v N o t 1 プライマー (図 1) を用いて P C R 増幅を行った。組み換えペプチドが A O X プロモーターの転写制御下でリーダーペプチド a - f a c t o r により可溶性発現に誘導されるように、得ら

10

20

30

40

50

れるPCR生成物をpPICZaCベクター (Invitrogen、カールスバード、カリフォルニア) のXhoI-NotI部位に挿入した。

【0061】

特異的な上流プライマーを用いて、クローンされたHep-25-pPICZaCベクターを鋳型としてヘプシジン-20 (60bp) のPCR増幅に用いた。For hep 20 (5-GCGAGTGCATCGACGGCGCCATATGCATCTTCTGCTG-3) 及び前述したRevHep1 longプライマー。

【0062】

非標識ヘプシジンを発現させるために、両方の構築物は、pPICZaCベクターのc-myc及び6xHisエピトープの直前に停止コドンをもっていた。標識された構築物を生産するために、得られる組換プラスミドHep-25及びHep-20を適切な酵素修飾に供した。ベクター由来のXbaI及びSalI制限部位と組み合わせて、前記挿入物のFokI制限部位を、配列番号1の配列を有するヘプシジン-20、配列番号2の配列を有するヘプシジン-25、配列番号3の配列を有するヘプシジン-20d、及び、c-MycHisエピトープ又はHisのみのエピトープに結合した配列番号4の配列を有するヘプシジン-25d (配列番号5~8の配列を有する標識ヘプシジン及び標識ヘプシジン誘導体) を発現させるHep-25MycHis、Hep-20MycHis、Hep-25His及びHep-20Hisプラスミドの構築に用いた。

10

【0063】

すべてのDNA操作を記載されているように実行した (Sambrook J., Maniatis T., Fritsch E.F., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。また、DNA塩基配列決定によってすべての構築物を確認した。

20

【0064】

すべての組換プラスミドをPmeI制限酵素を用いて線形化し、さらに、電気穿孔法 (Biorad社、ハーキュリーズ、カリフォルニア) によりピキアパストリス (Invitrogen社、カールズバード、カリフォルニア) のX33株に転換した。30、3日間の培養後に、100µg/ml Zeocin (Invitrogen社、カールスバード、カリフォルニア) を含むYPD (1%酵母抽出物、2%ペプトン、2%デキストロース) 寒天平板上で選択を行った。

30

【0065】

ピキアパストリスにおける発現 - 各電気穿孔に由来するいくつかの個々のクローンを2ml BMGY (1%酵母抽出物、2%ペプトン、0.1Mリン酸カリウム緩衝液pH6.0、1.34%YNB、4×10⁻⁵%ピオチン及び1%グリセロール) の中で30で16時間培養した。続いて、発現を誘導するために2mlのBMMY (グリセロールに代えて0.5%メタノール) 中で細胞を再懸濁した。

【0066】

0.5体積%メタノールを毎日添加して5日間誘導した後に、非標識ペプチド用のポリクローナル抗ヘプシジン抗体 (Alpha Diagnostics社、サンアントニオ、テキサス)、又は、標識されたペプチド用の抗His- (Amersham Biosciences社、ピスカタウェイ、ニュージャージー) 若しくは抗Myc 9E.10 mAb (ATCC) を用いたドットプロット分析によって、ヘプシジンの発現について培養液上清を評価した。最も高収率のクローンを大規模発現に用いた。以後すべての調製において、メタノール誘導から36時間経過時に細胞を採集した。

40

【0067】

ペプチドの精製及び分析 - 培養液上清を0.22µmフィルタ (Millipore社、ベッドフォード、マサチューセッツ) を通して濾過し、濃縮し、1kDaフィルタ (Millipore社、ベッドフォード、マサチューセッツ) を具えるTFPプレップスケ

50

ール限外濾過システムを用いて50mMリン酸ナトリウム緩衝液、150mM NaCl
 に対して透析した。前述したように、セファデックスG-10カラム(Amersham
 Biosciences社 ピスカタウェイ、ニュージャージー)を用いたサイズ排除
 クロマトグラフィーに非標識ヘプシジンを供した(Tomosugi, N., Kawab
 ata, H., Wakatabe, R., Higuchi, M., Yamaya, H., U
 mehera, H., Ishikawa, I. (2006) Blood 108, 138
 1-7)。製造会社の使用説明書(Qiagen社、バレンシア、カリフォルニア)に従
 ってNi-NTA金属親和性クロマトグラフィーを用いてペプチドを含む6xHisの第
 1段階精製を行なった。50mMリン酸ナトリウム緩衝液pH8.0、150mM Na
 Cl、250mMイミダゾールを用いて陰性条件下で溶出させた。溶出液を凍結乾燥によ
 って濃縮し、さらに、ヘプシジン単量体を分離するために、製造会社の使用説明書に従
 って、100-7000Daのペプチドの分離に特異的なペプチドスーパーデックスカラム
 (Amersham社 Biosciences社、ピスカタウェイ、ニュージャージー)
)を具えるサイズ排除クロマトグラフィーに供した。FPLC AKTAシステム(Am
 ersham社 Biosciences社、ピスカタウェイ、ニュージャージー)を用
 いてすべてのサイズ排除クロマトグラフィー分析を行った。ペプチドを製造会社の使用説
 明書(Invitrogen社、カールスバード、カリフォルニア)に従って非還元条件
 下で4-12%のNuPAGE Novexビス/トリスゲルを用いた電気泳動に供し、
 その後クマシーブリリアントブルー染色を行った。製造会社の使用説明書(Invit
 rogen社、カールスバード、カリフォルニア)に従ってXCell IIPロットモジ
 ュールを用いて標識ヘプシジンのウェスタンブロットを行った。0.1µmの細孔径を有
 するプロトラン(Protran)ニトロセルロース膜(シュライヒャー&シュル社、ダ
 ッセル、ドイツ)をペプチドの輸送に用い、その後1:1000の希釈した抗His-
 MAbを用いてプローブした。HRP(1:5000に希釈したもの)と結合した抗マウ
 ス二次抗体は、DakoCytomation(カーペンテリア、カリフォルニア)によ
 って購入された。製造会社の使用説明書(Invitrogen社、カールスバード、カ
 リフォルニア)に従って蛍光定量システム(Quant-It Qubit)を用いて
 精製されたヘプシジンの定量を行った。Peptides International
 社(ルイビル、ケンタッキー)からコントロールとして用いた合成ヘプシジン25を購入
 した。

【0068】

抗菌分析 - 大腸菌ML35に対する抗菌活性について精製された組み換えヘプシジンの
 すべてを評価した。また、BL21(DE)はCFU分析である(Porter E.M
 ., van Dam E., Valore E.V., Ganz T., ヒト腸由来デフ
 ェンシン5の広域スペクトル抗菌活性, Infect. Immun. 65 (1997) 2
 396-2401)。細菌性細胞培養は、OD₆₀₀ = 0.2 (5 × 10⁷ cfu/ml
)に増殖し、20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)中で最終濃度10⁶ cfu
 /mlで再懸濁させた。様々な濃度ペプチドを加えて最終体積が100µlとなるように
 して、37、2時間の培養後に生存細胞を3枚のLB/寒天プレートに被覆させた。

【0069】

細胞系 - THP-1ヒト単球細胞系及びJ774マウス単球細胞系を、10%のFBS
 、2mMのL-グルタミン及び1%のペニシリン/ストレプトマイシン溶液を含むRPM
 Iの中において37で保持した。5%CO₂ RAW264.7マウス単球細胞系、及
 び、EcR293Tが核酸に導入された細胞(Dr. Kaplanの厚意により提供され
 たもの)(Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., V
 aughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T., K
 aplan, j. (2004) Science 306, 2090-3)を、10%のF
 BS、2mMのL-グルタミン及び1%のペニシリン/ストレプトマイシン溶液を補完し
 たDMEM(Gibco、米国)の中において37で保持した。核酸に導入されたフェ
 ロポルチン-GFPのエクジソンプロモーターの下における選択を維持するために、5%

のCO₂ 400 µg/mlゼオシン (Invitrogen社、カールスバード、カリフォルニア)及び400 µg/ml ジェネティシン (Gibco、米国)を、安定的に核酸が導入されたEcR293T細胞系に添加した。10 µM ボナステロン (sigma chem社、セントルイス マサチューセッツ)の添加はフェロポルチン - GFP [10]の発現を誘導した。

【0070】

ウェスタンブロッティング - 1 × 10⁶細胞 (RAW264.7、THP-1又はJ774)を6穴プレート内に被覆させ、さらに、12 - 20時間後に細胞を無血清DMEM中のヘプシジンを用いて37 °Cで4時間処理した。その後、細胞を、溶解緩衝剤 (1%トリトン、25 mM HEPES (pH 7.4)、150 mM NaCl、10%グリセロール、5 mM EDTA、0.5 mM PMSF、タンパク阻害剤 (ロッシュ社、マンハイム、ドイツ))の中で再懸濁し、さらに、ブラッドフォード分析法 (Biorad社、ヘラクレス、カリフォルニア)によって定量した。30 µgの細胞溶解産物を8%SDS-PAGEを用いて分析した。タンパクをハイボンドCニトロセルロース膜 (Amersham Biosciences社、ピスカタウェイ、ニュージャージー)に移し、さらに、一次抗体であるウサギ抗フェロポルチン (Alpha Diagnostics社、サンアントニオ、テキサス)、マウス抗TfR1 (Zymed、Invitrogen社、カールスバード、カリフォルニア)及びマウス抗アクトチン (Santa Cruz Biotech社、サンタクルーズ、カリフォルニア)の1:1000の希釈液で、その膜を4 °Cで一晩培養した。洗浄後に、HRPと結合した抗ウサギ二次抗体、及び、HRPと結合した抗マウス二次抗体の1:5000の希釈液 (Dako Cytomation社、カーピントリア、カリフォルニア)でその膜を室温で1時間培養した。化学発光分析キット (ECL、Amersham Biosciences社、ピスカタウェイ、ニュージャージー)を用いて特異的信号を検知した。Quantity-Oneソフトウェア (Biorad社、ヘラクレス、カリフォルニア)を使用してデンストメトリーによりバンドを定量した。データを平均値 ± 標準偏差で示す。スチューデントのt検定により統計分析を行った。

【0071】

LIP分析法 - LIP (不安定鉄貯蔵)レベルの変化を測定するために蛍光性金属検出カルセイン (Molecular Probes社、ユージン、オレゴン)を用いた (Murphy, A. T., Witcher, D. R., Luan, P., and Wroblewski, V. J. (2007) Blood 110, 1048 - 54)。1 × 10⁶ RAW264.7マクロファージを6穴プレート内に被覆させた。培養の16時間後に、37 °Cの無血清DMEMに組み換えヘプシジンを10 µMで4時間にわたって加え、続いて、0.25 µMカルセインを25 °Cにおいて30分間加えた。結合していないカルセインを洗い落とし、さらに、冷却したPBS中に細胞を再懸濁させた。Perkin Elmer LS55 蛍光性プレートリーダー (Perkin Elmer Life Sciences社、ボストン、マサチューセッツ) (488 nm励起、517 nm発光)を用いて蛍光を測定した。100 µM DFOの添加によって細胞外カルセインの消光を達成した。カルセインに拘束された細胞内鉄は、浸透速度が速い鉄キレート剤SIH (イソニコチニル ヒドラゾン サルチルアルデヒド)を100 µM添加することによって放出された。相対的变化をコントロールに対するパーセンテージで表す。

【0072】

架橋及びプルダウンアッセイ - Raw264.7細胞を2 × 10⁷細胞/mlの濃度で氷冷PBS及びHep25-Hisの中に再懸濁させ、さらに、最終濃度が10 mMとなるように陰性ペプチド又はPBSを4 °Cにおいて1時間添加した。ニコハク酸イミジルスベリン酸塩 (DSS、ピアス、ロックフォード、イリノイ)を室温で20分間加え、続いて、20 mMトリスHCl (pH 7.4)を用いて20分間消光した。上述したようにタンパク溶解物を抽出し、Ni²⁺-NTAアガロースを用いて4 °Cで一晩培養した。結合タンパクを1 Mイミダゾールを用いて溶出し、上述したように抗FPN1抗体を用いてウェ

10

20

30

40

50

スタンプロットにより分析した。

【0073】

免疫付与 - 0.4 ml の PBS に溶解し、等しい体積のフロイント完全抗原性補強剤 (Sigma Chem 社、セントルイス、マサチューセッツ) で乳化された 100 µg の His - 25 Hep を用いてウサギに皮下免疫付与を行った。免疫付与プロトコルには、1 回の注入からなる 3 つ免疫向上が含まれており、これは、それぞれ、配列番号 6 の配列を有する 100 µg の Hep - 25 His が 0.4 ml の PBS に溶解して、等しい体積のフロイント不完全抗原性補強剤 (Sigma Chem 社、セントルイス、マサチューセッツ) で乳化されている。最初の注入前に耳静脈から免疫化前の血清サンプルを得た。最後の免疫付与の 10 日後に耳静脈から評価採血を実行した。ELISA 分析を用いて抗体活性について血清を評価した。

10

【0074】

抗体精製 - 1 mg の 6 x His 合成ペプチド (Covance、プリンストン、ニュージャージー)、又は、0.5 mg の配列番号 6 の配列を有する Hep - 25 His ペプチドを、製造会社の取扱説明書 (Pharmacia Biotech、ピスカタウェイ、ニュージャージー) に従って 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.4)、0.5 M NaCl において、CNBr 活性化されたセファロースに結合させた。

【0075】

配列番号 6 の配列を有する Hep - 25 His ペプチドに対するポリクローナル抗血清を、33% 飽和硫酸アンモニウム沈殿 (Herbert, G. A., P. L. Pelham, and Pittman, B. (1973) Appl. Microbiol. 25, 26-36) に供し、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、150 mM NaCl に対して透析した。その後、その血清を 6 x His が結合したセファロースビーズと共に 40 で一晚培養し、その後、上清を保持した。その一方で、カラムを 0.2 N の HCl グリシン (pH 2.8) を用いて 2 回洗浄することにより再生し、1 M の K₂HPO₄ で中和した。最後にカラムを 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、150 mM NaCl で洗浄し、PBS (0.02% アジ化物) 中において 4 で保管した。上記精製処理を 5 回繰り返した。結果物の精製された血清を、Hep - 25 His が結合したセファロースカラムを用いて培養することにより 4 で一晚さらに精製した。翌日、PBS を用いてカラムを 2 回洗浄した後に、特異的な抗 Hep 25 抗体を等しい体積の 0.2 N HCl グリシン (pH 2.7) で溶出し、1 M トリス pH 9、5 M NaCl を用いて中和した。

20

30

【0076】

免疫組織化学 - ヘプシジン 25 - His に対する抗体が天然ヘプシジンを識別することができるか否かを決定するために、通常のマウス肝組織を用いて免疫組織化学的分析を行った。組織に対して、それぞれ、キシレン中で 5 分間の脱パラフィン処理を 2 回行い、さらに、エタノール希釈物 (100%、95%、70%) 中で 2 分間脱水を行った。3% 過酸化水素に 30 分間沈め、その後に水道水に 5 分間沈めることによって内因性ペルオキシダーゼ活性を消滅させた。スライドを 10 mM シトレート緩衝液 (pH 6.0) 中での浸漬させ、電子レンジで各 5 分の加熱を 3 回行い、さらに、その後に該スライドを 20 分間室温まで冷ますことによって抗原回復を実現した。その後、それらのスライドをブロッキング溶液 (3% FBS、1% BSA、0.05% トウイン (Tween) が含まれる TBS) 中で 30 分間培養し、さらに、精製された一次抗体 (10 mg/ml) を用いて 4 で 16 時間培養した。さらに、それらのスライドを HRP (Dako Cytomat ion、カーピントリア、カリフォルニア) に結合した二次抗ウサギ抗体 (ブロッキング緩衝液中に 1:100 で希釈されているもの) 中で 1 時間培養した。3,3'-ジアミノベンジン基質 (Sigma、セントルイス、ミズーリ) を 5 分間添加した後に染色の視覚化を実行した。水道水で洗浄することによってその反応を停止させ、さらに、ヘマトキシリン (Sigma、セントルイス、ミズーリ) を用いてスライドを 1 分間対比染色した。その後、それらを 70%、95% 及び 100% のエタノール系においてそれぞれ 2 分間ずつ脱水し、それぞれ 5 分間キシレンに 2 回浸漬することにより除去し、さらに、DPX (S

40

50

igma、セントルイス、ミズーリ)に据え付けた。ネガティブコントロールとして二次抗体を単独で用いた。さらに、Hep 25-His-ペプチド(1mg/ml)を含むポリクローナル抗体を4で一晚予備培養することにより競合試験を行った。

【0077】

酵素結合免疫吸着定量法(ELISA)-微量定量プレート(96穴)(Costar、コーニング、ニューヨーク)を、50 μ lの0.1M重炭酸ナトリウム緩衝液(pH 8.6)の中の(配列番号6の配列を有する)Hep-25His、6xHis又はBSA(0.5 μ g/ml)により4で一晚被覆させた。プレートを洗浄し、さらに、非特異的結合部位をブロッキング緩衝液(3%BSAを含むPBS)を用いて37で1時間閉鎖した。抗血清(3%BSAを含むPBS中で1:3000に希釈されたもの)を、各穴に添加し、その穴を37で1時間培養した。競合試験のために、精製された抗血清(3%BSAを含むPBSで1:3000に希釈されたもの)を、8 μ lヒト血清又は様々な既知濃度のHep-25Hisペプチド(配列番号6の配列を有する。)と共に4で一晚培養した。翌日に複合体を穴に入れ、同様に37で1時間培養した。結合していない抗体をPBSTを用いて10回洗浄することにより除去した。さらに、それらのプレートを、ヤギ抗ウサギIgGペルオキシダーゼ複合体(3%BSAを含むPBS中で1:2000に希釈されたもの)(DakoCytomation、カービンテリア、カリフォルニア)と共に室温で1時間培養した。前と同様にプレートを洗浄し、さらに、3,3',5,5'テトラメチルベンジジン(Pierce、ロックフォード、イリノイ)を室温において10分間添加した後に信号の視覚化を達成した。0.2N硫酸を添加し、マイクロプレートリーダー(Bio-rad Model 680)を用いて450nmにおいて測光分析的に発色現象を測定した後に、その反応を停止させた。すべての試験を4回繰り返して行った。

【0078】

結果

酵母ピキアパストリスにおける組み換えヘプシジンの可溶性発現及び精製-メチロトローフ酵母ピキアパストリス中で、ヘプシジン-20及び25の組み換え可溶性発現のために、3つの異なる構築を連続して行った。a)非標識ペプチド(配列番号1及び2の配列を有するHep-20及びHep-25)、b)myc-Hisを有するペプチド(Hep-20MycHis及びHep-25MycHis(配列番号7及び8の配列を有する))、並びに、c)ヘプシジン配列の3'末端にHis標識を有するペプチド(図1)(配列番号5及び6の配列を有するHep-20His及びHep-25His)。それぞれの構築物について、いくつかのクローンをメタノールによって3日間誘発した。また、ドットプロット免疫学的検定によってヘプシジン発現について培養液上清を分析した。最も高く発現するクローンを大規模生産用を選択した。組み換えペプチドを、液上清から採取し、濃縮し、限外濾過システム(1kDaを遮断するフィルタ)により透析し、さらに、非標識ペプチド及び標識されているペプチドを、それぞれ、サイズ排除クロマトグラフィー又はNi²⁺-NTA金属親和性クロマトグラフィーによって精製した。簡潔に、Hep-20Hisペプチドを発現する陽性クローンは検出されなかった。しかし、精製された非標識ヘプシジン-20及び-25の収率は、20 μ g/l未満であった。培地1リットル当たり約20ngという、精製された非標識ペプチドの低い収率は、精製及び検出の難しさのためであり、発現しているペプチドの潜在的毒性のためではないように考えられる。対照的に、Hep-25MycHis、Hep-20MycHis及びHep-25Hisで標識されたペプチドの収率は、培地当たり約5-7mg/lであった。4-12%のNuPAGEゲル及びクーマシーブリリアントブルー染色(図2A)により精製された標識生成物を分析した。Hep-25Hisの分子量は4kDaであると推定され、Hep-25MycHisの分子量は5.2kDaであると推定され、Hep-20MycHisの分子量は4.8kDaであると推定される。溶出したペプチドは、さらに高い高分子量のバンドであって、抗myc又は抗His-mAbs(図2B)を用いたウェスタンブロットによって確認されるオリゴマー形態に対応するバンドをいくつか含んでいた。

標識ヘブシジンをさらに精製するために、スーパーデックスペプチドカラム（アマシャム生物科学、ピスカタウェイ、ニュージャージー）を用いてFPLCサイズ排除クロマトグラフィーを実行した（図3）。4 - 12% Nu - PAGEゲルを用いて、目的の分子量に対応する結果物の画分を分析した（図4）。ペプチドは、アミノ酸配列から予想されるのと同じ分子量を有する単量体のように移動した。精製された組み換え標識ヘブシジン単量体の収率は、0.5 - 1 mg / lの培養であった。

【0079】

組み換えヘブシジンの抗菌活性 - 精製された組み換えヘブシジン形態の大腸菌株ML35に対する抗菌活性を測定するために、コロニー形成単位分析（E. M. Porter, E. van Dam, E. V. Valore, T. Ganz, Broad-spectrum antimicrobial activity of human intestinal defensin 5, Infect. Immun. 65 (1997) 2396 - 2401）を用いた。ヘブシジンに耐性を有する大腸菌BL21 (DE)株をネガティブコントロールとして用いた。様々な濃度を有する組み換えヘブシジン製剤、合成ヘブシジン又は陰性のペプチドと共に37で2時間培養した後で、生存する微生物をカウントした。ヘブシジン - 25（配列番号2の配列を有する。）は、十分な量の中で生産されなかった（データは示されず）ので、評価することができなかったが、組み換え非標識ヘブシジン - 20（配列番号1の配列を有する。）は、10 mMより高い濃度において殺菌力を有していた。標識形態（図3）において、組み換えHep25 - His（配列番号6の配列を有する。）が最も高い抗菌活性（IC50 = 15 mM）を示したが、Mycエピトープを含むペプチドであるHep25 - MycHis（配列番号8の配列を有する。）は、おそらくその立体構造の著しい変化により、それほど有効ではなかった（IC50 = 58.6 mM）。Hep25 - Hisの抗菌活性（配列番号6の配列を有する。）は、図3に示されているように合成ヘブシジン25（配列番号2の配列を有する。）（IC50 = 9 mM）と同等であった。それらのすべてがヘブシジン耐性大腸菌BL21 (DE)に対して何の効果もなかった。

【0080】

組み換えヘブシジンを用いた治療後にRAWm264.7マクロファージに鉄が蓄積される - 不安定鉄貯蔵（LIP）分析により、組み換えヘブシジンを用いた治療後の細胞の鉄恒常性の変化も研究した（Konijn A. M., Glickstein H., Vaisman B., Meyron-Holtz E. G., Slotki I. N., Cabantchik Z. I., (1999) Blood 94, 2128 - 34）。種々の形態の組み換え標識ヘブシジンを10 μMで用いてRAWm264.7マクロファージを37で4時間処理した。FAC（30 μg / ml）をポジティブコントロールとして用いた。処理していない細胞と比較して、LIPは3倍（±0.2）増加した（p < 0.001）（図6）。Hep - 25 His（配列番号6の配列を有するペプチド）が存在する状態で、LIPは、約2.5倍（±0.21）増加した（p < 0.001）。しかし、Hep - 25 MycHis（配列番号8の配列を有するペプチド）は、LIPの約2倍（±0.44）（p < 0.05）に増加させた（図7）。Hep - 20 MycHis（配列番号7の配列を有するペプチド）は、LIPに対して相対的に低い効果、1.85倍（±0.52）（p < 0.05）を示した。Mycを含むペプチド及び試験間で大きな分散があったものの、Hep25 - Hisは、LIP分析において最も顕著で一貫した変化を示した。

【0081】

マクロファージにおいて組み換えヘブシジンがフェロポルチン及びTfR1を抑制するように制御する - マクロファージ細胞系において、フェロポルチン（FPN1）及びTfR1の発現レベルを測定することにより、細胞の鉄代謝に対する組み換えヘブシジンの効果を評価した。1 μM及び10 μMのヘブシジン25（配列番号2の配列を有する。）及び37で4時間行った抗菌性分析及びLIP分析において最も活性の高いペプチドであるHep - 25 His（配列番号6の配列を有する。）を用いてRAW264.7細胞

10

20

30

40

50

を処理し、ウエスタンブロット解析によって細胞溶解産物中のFPN1及びTfR1の発現を検出した(図7)。処理されていない細胞との比較すると、それぞれ、1 μ Mの濃度のHep-25Hisは、FPN1を37% \pm 7%減少させることができた一方で、10 μ Mの濃度のHep-25Hisは、TfR1を48% \pm 17.7%減少させ、FPN1を48% \pm 3%減少させた(図7A、B)。合成ペプチドは、10 μ Mにおいて、TfR1を37% \pm 6%阻害し、FPN1を36% \pm 10.6%阻害した。組み換えペプチドをより高い濃度にしても、より強い効果は得られなかった(データを示さず)。また、Hep25-Hisのオリゴマー画分を評価したが、細胞の鉄代謝に対する効果は認められなかった(データを示さず)。組み換えペプチド(データを示さず)でヒトTHP-1及びマウスJ774の単球の細胞を処理したときにも同様の結果が得られた。これらの結果は、組み換えヘプシジンがFPN1に結合し、FPN1の内在化及び分解を誘導することができ(Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Ganz, T., Kaplan, J. (2004) Science 306, 2090-3)、さらに、鉄吸収を最小化するためにTfR1発現を減少させることを示唆している。

【0082】

Hep25-Hisはフェロポルチンに結合して機能し、その後の内在化を誘導するHep25-His(配列番号6の配列を有する。)のFPN1に対する特異的結合を架橋及びプルダウンアッセイにより研究した。Hep25-His(配列番号6の配列を有する。)又は陰性のペプチド(配列番号9の配列を有する。)を10nMで用いてRAW264.7を処理し、その後、DSSを用いた架橋及びNi²⁺-NTAアガロースを用いたプルダウンアッセイを行った。Ni²⁺-NTAから溶出させたタンパク複合体を抗フェロポルチン抗体を用いたウエスタンブロット法に供した。図7Cに示されているように、架橋及びプルダウンアッセイ後に、FPN1をHep25-Hisと共に共精製したところ、組み換えHep25-HisペプチドがFPN1に特異的に結合することが示唆された。

【0083】

更に、HEK293-Fpn細胞において、Hep25-His(配列番号6の配列を有する。)の存在下でのFPN1の内在化を共焦点顕微鏡によって分析した。これらの細胞は、FPN1-GFP融合構造物を細胞膜表面に発現する(Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Ganz, T., Kaplan, J. (2004) Science 306, 2090-3)。組み換えHep25-His(配列番号6の配列を有する。)の添加によりFPN1-GFP(図7D)の内在化が促進された。合成Hep-25ペプチドをポジティブコントロールとして用いたとき、同様の結果が得られた。

【0084】

ヘプシジンに対するポリクローナル抗体の産生及び精製 - ウサギにおいてHep-25His(配列番号6の配列を有するペプチド。)に対するポリクローナル血清を調達した。3回強化した後に、ELISA(図8)を用いて血清の抗体活性について評価した。IgG免疫グロブリンを特異的に沈殿させるためにポリクローナル抗血清を33%アンモニウム硫酸塩沈殿に供した。沈殿及び透析された抗血清はヘプシジン及びHis-ペプチドの両方に対する抗体を含んでいた。抗His-抗体をすべて除去するために、6Hisが結合したセファロースカラムに由来する通路の繰り返しに抗血清を供した。各精製ステップからの上澄みを、H25His、6xHisペプチド及びBSA(図8)に対するELISA分析法において評価した。5回精製された抗血清はH25Hisペプチドを特異的に認識した(データは示されず)。Hep-25Hisセファロースを用いてさらに精製した抗血清についても同様にした。天然ヘプシジンに対する結合活性を測定するために、パラフィン表面に埋め込まれたマウス肝切片について免疫組織化学を行った(図9)。抗体は、強い細胞質染色を示したが、該染色は、ヘプシジン25-Hisを用いた予備培養後に消失した。

10

20

30

40

50

【0085】

競合ELISA分析 - 組み換えペプチドをそれに対して調達された抗体とともにヒト血清中へブシジンの定量用の免疫学的分析の発展のために用いた。(J. R. Crowther, The ELISA guidebook, Methods Mol Biol 149 (2000) III - IV, 1 - 413)に従って抗原及び抗体の最適濃度を決定した後、ELISAシステムの特性評価に移行した。

【0086】

この阻害ELISA法により、組み換えへブシジン25-Hisについての標準検量線(図10に示されているもの)を作り出した。ELISA分析の分析的検出限界であって、10回のゼロキャリブレーションの平均信号+3(標準偏差)に対応する濃度として定義される分析的検出限界は、 $5.4 \mu\text{g/L}$ であった。測定範囲は $10 - 1500 \mu\text{g/L}$ であった。へブシジンELISA分析の再現性、線形性及び回復の統計的分析のために、評価された多数のサンプルから選択した低いレベル($22 \mu\text{g/L}$)から高いレベル($150 \mu\text{g/L}$)までの3つの濃度の血清サンプルを用いた。各サンプルを単一の分析法によって10回反復して評価したとき、測定内変動係数(intra-assay CV)は8 - 15%であった。7つの試験サンプルの事後測定によって評価したとき、測定内変動係数は5 - 16%であった。分析的な回復は各血清サンプルにおいて7.5、30及び $75 \mu\text{g/L}$ で目盛りを加えることにより研究され、90から120%まで変動し、平均回復指数は105%であることが分かった。3つの血清サンプルの3つの系列希釈物(1:2、1:4、1:8)を測定した後、平均の線形性は97%と推定された。

10

20

【0087】

この分析法が生物学的に意味のある測定を提供するものであるか否かを判断するために、健康なコントロールと比較して、低いへブシジンレベルを有すると予想される患者(HJV関連若年性血色素症)に由来する血清サンプルを評価した。

【0088】

図11に示されているように、平均へブシジン濃度は、年齢が一致する健康なコントロール($34.3 \mu\text{g/L}$)と比較して、7人の若年性血色素症患者において有意に低かった($12.8 \mu\text{g/L}$ 及び $p < 0.05$)。この結果は、この病気におけるへブシジンのレベルに関する以前の発見と一致しており、この新しいELISAシステムにより血清中のへブシジン量を有効に測定することができると考えられる。しかし、他の定量化技術を用いた以前の報告と比較して、この分析法においてグループ間又はグループ内で折り目変化がはるかに低かったことに注目することは重要である。これは、ばらつきが大きいサンプル間の違いの識別における制限である可能性がある。更に、ポリクローナル抗体と先端を切断された20個のアミノ酸のへブシジンのようなへブシジンの他の形態との相互作用の可能性を排除することができない。

30

【 図 1 】

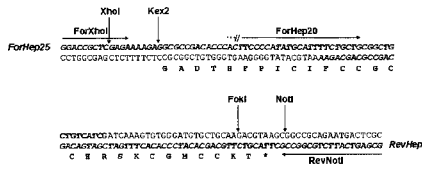


Figure 1.

【 図 2 】

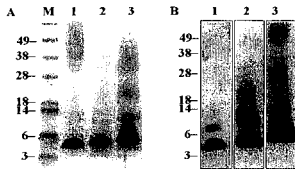


Figure 2.

【 図 3 】

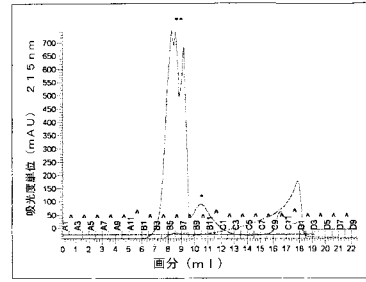


Figure 3.

【 図 4 】

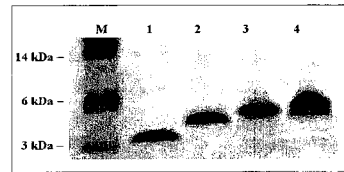


Figure 4.

【 図 5 】

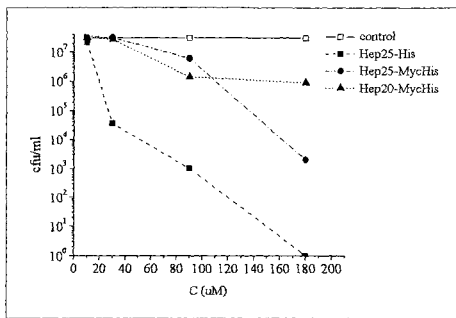


Figure 5.

【 図 7 】

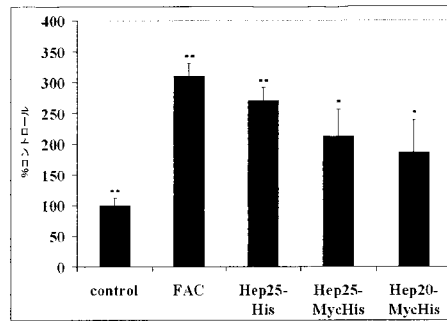


Figure 7.

【 図 6 】

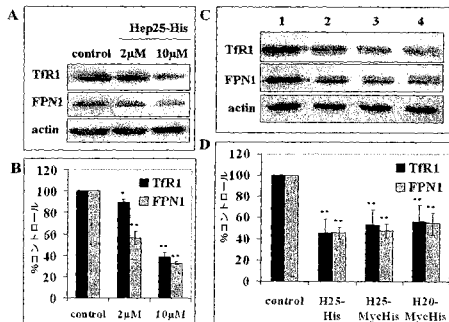


Figure 6.

【 図 8 】

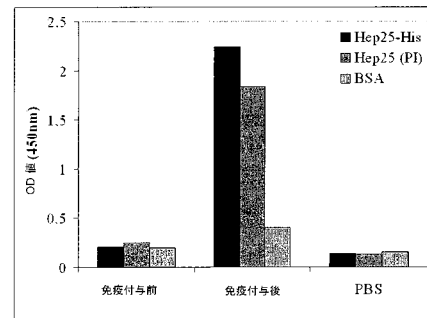


Figure 8.

【 図 9 】

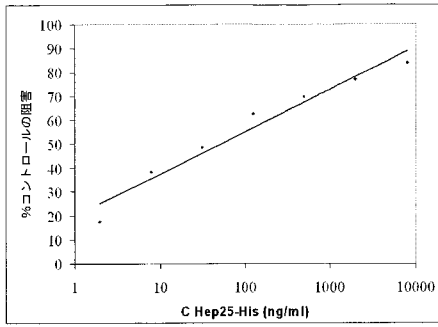


Figure 9.

【 図 1 1 】

- 配列番号 1 ICIFCCGCCHRSKCGMCKT
- 配列番号 2 DTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCKT
- 配列番号 3 GAICIFCCGCCHRSKCGMCKT
- 配列番号 4 GADTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCKT
- 配列番号 5 GAICIFCCGCCHRSKCGMCKTFDHHHHHH
- 配列番号 6 GADTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCKTFDHHHHHH
- 配列番号 7 GAICIFCCGCCHRSKCGMCKCLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH
- 配列番号 8 GADTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCKCLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

Figure 11

【 図 1 0 】

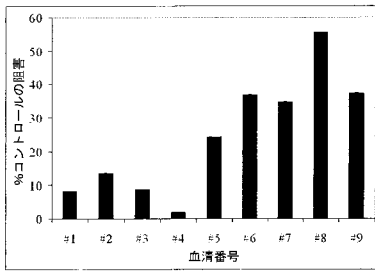


Figure 10.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GR2008/000056
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/575 C07K16/26 A61K38/22 A61K39/395 G01N33/68 G01N33/78 C12P21/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K G01N C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	KOLIARAKI V ET AL: "Iron regulatory and bactericidal properties of human recombinant hepcidin expressed in Pichia pastoris" BIOCHIMIE, MASSON, PARIS, FR, vol. 90, no. 5, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 726-735, XP022623431 ISSN: 0300-9084 [retrieved on 2008-02-06] abstract page 726 - page 735 figure 1 ----- -/--	1-3,5-44
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 April 2009		Date of mailing of the international search report 06/05/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Tudor, Mark

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GR2008/000056

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- a sequence listing
- table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- on paper
- in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the international application as filed
- filed together with the international application in electronic form
- furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GR2008/000056

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHANG H ET AL: "Cloning and Secretion Expression of Hepcidin in Pichia pastoris" CHINESE JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY,, vol. 23, no. 3, 1 May 2007 (2007-05-01), pages 381-385, XP022857401 ISSN: 1872-2075 [retrieved on 2007-05-01]	1,7,15, 16,18, 20,21
Y	abstract page 381 - page 385 figure 1	2,3, 5-14,17, 19,22-44
Y	WALLACE ET AL: "Purification and partial characterisation of recombinant human hepcidin" BIOCHIMIE, MASSON, PARIS, FR, vol. 88, no. 1, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 31-37, XP005176069 ISSN: 0300-9084 abstract page 32, left-hand column, paragraphs 2,4 page 32, right-hand column, paragraphs 2,3 page 33, right-hand column, paragraph 4 page 34, right-hand column, paragraph 2 - page 35, right-hand column, line 26	1-3,5-44
Y	ZHANG H ET AL: "Expression and preparation of recombinant hepcidin in Escherichia coli" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 41, no. 2, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 409-416, XP004875132 ISSN: 1046-5928 abstract page 409, right-hand column, lines 14-16 page 411, left-hand column, paragraph 2 - page R, paragraph 1 page 412, left-hand column, paragraph 5 - right-hand column, paragraph 2 page 413, left-hand column, paragraph 3 page 414, right-hand column, paragraph 3 - page 415, left-hand column, paragraph 1 figure 1	1-3,5-44
Y	US 2004/096987 A1 (GEACINTOV CYRIL E [US] ET AL KULAKSIZ HASAN [DE] ET AL) 20 May 2004 (2004-05-20) paragraphs [0008], [0019], [0055], [0079] - [0098] claims 1,3-12,14	1-3,5-44

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GR2008/000056

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>NEMETH ELIZABETA ET AL: "The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study" BLOOD,, vol. 107, no. 1, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 328-333, XP002519931 abstract page 330, left-hand column, paragraph 2 page 331, right-hand column, paragraph 3 - page 332, left-hand column, line 5 figures 1,3 table 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-3,5-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GR2008/000056**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
19, 23, 36, 37 (completely), 1-3, 5-18, 20-22, 24-35
38-44 (partially) (Inventions 1 and 8)
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GR2008/000056

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1, 7, 9-17, 20, 21 (all partially)

A method for producing biologically functional hepcidin in *P. pastoris*; wherein said hepcidin is purified in a two stage process; wherein said two stage process comprises metal affinity chromatography and gel filtration chromatography; wherein said hepcidin is defined by SEQ ID No: 1-8; the use of *P. pastoris* to express hepcidin.

Invention 2: claims 2-17, 20, 21 (all partially)

A method for producing tagged hepcidins in an expression system; wherein said expression system is *P. pastoris*; wherein said hepcidin is purified in a two stage process; wherein said two stage process comprises metal affinity chromatography and gel filtration chromatography; wherein said hepcidin is defined by SEQ ID No: 5-8.

Inventions 3-6: claims 1, 7, 9-16, 18, 20, 21, 34, 35, 38-40 (all partially)

Hepcidin polypeptides defined by SEQ ID Nos: 1-4, respectively; a method of producing said hepcidin using *P. pastoris*; a method of determining the amount of hepcidin in a serum sample using an immobilized form of said hepcidin; and, an ELISA kit comprising said hepcidin.

Invention 7: claims 1-3, 5-16, 18, 20-22, 24-35, 38-44 (all partially)

A hepcidin polypeptide defined by SEQ ID No: 5; methods of producing said hepcidin; an antibody which specifically binds said hepcidin; the use of said hepcidin to raise antibodies; the use of said hepcidin as an antibacterial agent; the use of said hepcidin in controlling iron metabolism; the use of said antibody in a competition ELISA assay for determining the amount of hepcidin in a sample; a method of determining the amount of hepcidin in a serum sample using an immobilized form of said hepcidin; an ELISA kit comprising said hepcidin; the use of said hepcidin for treating or preventing haemochromatosis; the use of said antibody for treating or preventing anaemia or a disease resulting therefrom or a condition associated with low iron levels.

Invention 8: claims 19, 23, 36, 37 (completely), 1-3, 5-18, 20-22, 24-35, 38-44 (partially)

International Application No. PCT/GR2008/000056

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Idem as invention 7 but wherein said hepcidin polypeptide is defined by SEQ ID No: 6.

Inventions 9 and 10: claims 1-16, 18, 20-22, 24-35, 38-44 (all partially)

Idem as invention 7 but wherein said hepcidin polypeptide is defined by SEQ ID Nos: 7 and 8, respectively.

Inventions 11 and 12: claims 34, 35, 38-40 (all partially)

A method of detecting the amount of hepcidin in a serum sample using an antibody directed against SEQ ID Nos 1 and 2, respectively; and, an ELISA kit comprising said hepcidin and said antibody.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GR2008/000056

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004096987	A1	CN 101076730 A	21-11-2007
		US 2004096990 A1	20-05-2004
		US 2007092916 A1	26-04-2007

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	7/06		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		D
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		N
			C 1 2 N	1/19		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100096024

弁理士 柏原 三枝子

(74)代理人 100125520

弁理士 高橋 剛一

(74)代理人 100155310

弁理士 柴田 雅仁

(72)発明者 ママラキ, アヴギ

ギリシャ共和国 アテネ ジーアール - 1 0 6 8 3, スピリドノストゥリコウピストリート 4 3

(72)発明者 マリノー, マルサ

ギリシャ共和国 ネアマクリアアッティキス, ポシドノストリート 2 0

(72)発明者 コリアラキ, バシリキ

ギリシャ共和国 コリダロスアッティキス ジーアール - 1 8 7 5 7, ミストラストリート 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA01 CA06 DA12 EA04 GA14

4B065 AA77X AA93Y AB01 AC14 BA03 CA24 CA44 CA46

4C085 AA13 AA14 BB31 EE01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA50 CA40 DA30 DA75 EA20

EA50 FA72 FA74 GA22 GA26

专利名称(译)	肽激素的生产过程		
公开(公告)号	JP2010536364A	公开(公告)日	2010-12-02
申请号	JP2010521489	申请日	2008-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	莱斯尼克·巴斯德研究所 HELLENIC INST巴斯德 Mamarakiavugi MAMALAKI AVGI		
申请(专利权)人(译)	Renikku巴斯德研究所 Mamaraki , Avugi		
[标]发明人	ママラキアヴギ マリノーマルサ コリアラキバシリキ		
发明人	ママラキ,アヴギ マリノー,マルサ コリアラキ,バシリキ		
IPC分类号	C12N15/09 G01N33/53 G01N33/543 C07K14/575 C07K16/26 A61P7/06 A61K39/395 C12N1/19		
CPC分类号	C07K14/575 A61K38/00 C07K16/26 C07K2317/34 C07K2317/77 C07K2319/21 C07K2319/41 G01N33/74		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A G01N33/53.B G01N33/543.501.A C07K14/575 C07K16/26 A61P7/06 A61K39/395.D A61K39/395.N C12N1/19		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA01 4B024/CA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA14 4B065/AA77X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA03 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA30 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA22 4H045/GA26		
代理人(译)	Goichi高桥		
优先权	20070100553 2007-08-24 GR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种在巴斯德毕赤酵母中生产生物功能性铁调素的新方法。本发明进一步提供了新型标记的铁调素，抗体及其在治疗和免疫测定中的用途。

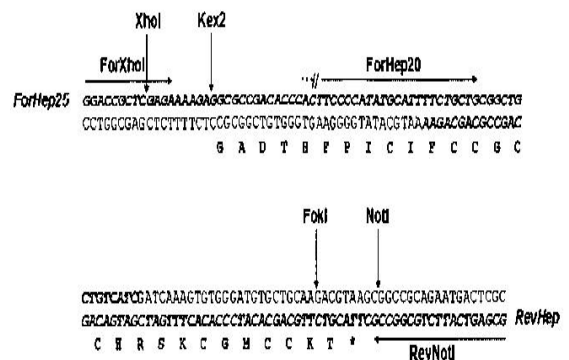


Figure 1.