

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 609**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2013 PCT/US2013/067771**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14071015**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2013 E 13851277 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 2914619**

54 Título: **Polipéptidos ERFE y eritroferrona y métodos de regulación del metabolismo del hierro**

30 Prioridad:

01.11.2012 US 201261721322 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.11.2019

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**GANZ, TOMAS;
NEMETH, ELIZABETA y
KAUTZ, LEON**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 731 609 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos ERFE y eritroferrona y métodos de regulación del metabolismo del hierro

5 Referencia a una lista de secuencias presentada a través de EFS-WEB

El contenido del archivo de texto ASCII de la lista de secuencias denominada "20131031_034044_119WO1_seq_ST25", que tiene un tamaño de 14.3 kb, se creó el 28 de octubre de 2013, y se envió electrónicamente a través de EFS-Web junto con la solicitud.

10

Reconocimiento de apoyo gubernamental

Esta invención fue realizada con el apoyo del Gobierno de las Subvenciones Nos. R01 DK 082717 y RO1 DK 065029, otorgadas por el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK) de los Institutos Nacionales de la Salud. El Gobierno tiene determinados derechos en esta invención.

15

Antecedentes de la invención

El documento WO 2006/046073 describe la proteína INSP162, que tiene identidad con la SEQ ID NO: 1 divulgada en la presente divulgación.

20

El documento WO 2010/040998 describe un péptido SEQ ID NO: 37 que tiene una similitud de secuencia con la SEQ ID NO: 3 divulgada en la presente divulgación.

25

1. Campo de la invención

La presente divulgación se relaciona con polipéptidos que regulan el metabolismo del hierro y con métodos de fabricación y uso de los mismos.

30

2. Descripción de la técnica relacionada

La producción de glóbulos rojos es, por mucho, el principal consumidor de hierro en el cuerpo. La existencia de hormonas que regulan el hierro en respuesta a las necesidades de la producción de glóbulos rojos ha sido propuesta hace más de 50 años por Finch et al. entre otros. Véase Finch 1994. Desafortunadamente, Finch et al., nunca descubrieron ninguna de estas hormonas.

35

Otros investigadores examinaron las causas del aumento de la absorción de hierro en la talasemia y propusieron que dos sustancias, GDF15 y TWSG1, pueden causar supresión de hepcidina y sobrecarga de hierro en esta enfermedad, pero concluyeron que esta no era la señal fisiológica para la absorción de hierro. Véase Tanno 2010b y Casanovas 2013. Nunca se mostró específicamente la función de GDF15 o TWSG1 en la sobrecarga de hierro de la talasemia.

40

Resumen de la invención

La invención está dirigida a un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente un polipéptido ERFE o una composición del mismo para el uso en el tratamiento de una enfermedad de sobrecarga de hierro y/o un trastorno asociado con niveles anormalmente bajos de hepcidina, en donde el polipéptido ERFE comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de por lo menos una de las SEQ ID Nos: 1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12-14, AHSVDPDRAWMLFVX₁QSDKGX₂N (SEQ ID NO: 5) en donde X₁ es R y X₂, es V; VX₁RRALHELGX₂YYLPX₃ (SEQ ID NO: 8) en donde X₁ es E, X₂, es V y X₃, es D; X₁MGLE X₂SSELTISVNGVLYLQ (SEQ ID NO: 11) en donde X₁ es I y X₂, es S; y SLTVRSGSHFSAX₁LLGX₂ (SEQ ID NO: 15) donde X₁ es V y X₂, es V, en donde la enfermedad de sobrecarga de hierro y/o el trastorno asociado con niveles anormalmente bajos de hepcidina se selecciona del grupo que consiste en: síndromes mielodisplásicos, hemocromatosis hereditaria, anemias de carga de hierro, hepatopatías alcohólicas, hepatitis C crónica, talasemia alfa, talasemia beta, anemias diseritropoyéticas congénitas y hepatitis B crónica.

55

El anticuerpo monoclonal o una composición del mismo para el uso de la invención puede comprender un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

60

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal se genera contra un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

65

La presente divulgación está dirigida a un polipéptido aislado, purificado, sintético y/o recombinante que comprende una secuencia terminal C que tiene aproximadamente 95-100%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente el 99% de la identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de terminal N-que tiene aproximadamente 70-100%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, o

5 por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la presente invención está dirigida a un polipéptido aislado, purificado, sintético y/o recombinante que consiste esencialmente de o consiste de una secuencia terminal C que tiene aproximadamente 95-100%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 16 y una secuencia de terminal N que tiene aproximadamente 70-100%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17. La presente divulgación está dirigida a un polipéptido aislado, purificado, sintético y/o recombinante que tiene aproximadamente 70 a 100%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

15 La presente divulgación está dirigida a un polipéptido aislado, purificado, sintético y/o recombinante que comprende, consiste esencialmente en, o consiste de por lo menos una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15, en donde X es cualquier aminoácido. La presente divulgación está dirigida a un polipéptido aislado, purificado, sintético y/o recombinante que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en todas las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, y SEQ ID NO: 15, en donde X es cualquier aminoácido.

20 Los polipéptidos descritos en el presente documento reducen los niveles de ARNm de hepcidina hepática y/o hepcidina en suero en sujetos humanos cuando se administran a los mismos.

25 Los polipéptidos descritos aquí exhiben actividad eritrofrona que es igual o sustancialmente similar a aquella de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. Los polipéptidos descritos aquí exhiben una actividad eritrofrona que es aproximadamente 60-100%, aproximadamente 70-100%, aproximadamente 80-100%, aproximadamente 90-100%, o aproximadamente 95-100% de la proporcionada por la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

30 La presente divulgación está dirigida a un polipéptido aislado, purificado, sintético y/o recombinante que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en por lo menos aproximadamente 10, por lo menos aproximadamente 11, por lo menos aproximadamente 12, por lo menos aproximadamente 13, por lo menos aproximadamente 14, por lo menos aproximadamente 15, por lo menos aproximadamente 16, por lo menos aproximadamente 17, por lo menos aproximadamente 18, por lo menos aproximadamente 19, por lo menos aproximadamente 20, por lo menos aproximadamente 21, por lo menos aproximadamente 22, por lo menos aproximadamente 23, por lo menos aproximadamente 24, o por lo menos aproximadamente 25 residuos de aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 16.

Los polipéptidos descritos aquí se fabrican utilizando técnicas sintéticas o recombinantes.

40 La presente divulgación está dirigida a una molécula de ácido nucleico recombinante aislada, purificada, sintética y/o que comprende, consiste esencialmente o consiste de una secuencia que codifica un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación.

45 La presente divulgación está dirigida a una célula recombinante que es capaz de expresar un polipéptido de acuerdo con la presente invención y/o que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación.

50 La presente invención está dirigida a un anticuerpo que se generó contra un polipéptido de acuerdo con la descripción. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humano.

En algunas realizaciones, la presente invención está dirigida a una composición que comprende, consiste esencialmente en, o consiste de

55 un anticuerpo que se generó contra un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación. En algunas realizaciones, la composición comprende

un anticuerpo que se generó contra un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación en una concentración que es mayor que la encontrada en sujetos normales.

60 La presente invención está dirigida al uso de un anticuerpo de la invención para tratar una enfermedad de metabolismo del hierro en un sujeto.

65 En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto lo necesita. Como se utiliza aquí, un "sujeto necesitado" es aquel a quien se le ha diagnosticado que tiene o padece una enfermedad de

metabolismo del hierro. La enfermedad de metabolismo del hierro es una enfermedad por sobrecarga de hierro o una enfermedad y/o trastorno asociado con niveles anormalmente bajos de hepcidina.

El polipéptido administrado al sujeto puede ser un polipéptido -ERFE. El polipéptido administrado al sujeto puede ser un polipéptido +ERFE. Se pueden administrar uno o más polipéptidos en una cantidad efectiva, preferiblemente una cantidad terapéuticamente efectiva. El método descrito aquí puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la regulación de la cantidad de hepcidina en el sujeto al administrarle al sujeto un polipéptido ERFE en una cantidad efectiva, preferiblemente una cantidad terapéuticamente efectiva. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende medir la cantidad de uno o más polipéptidos ERFE y/o hepcidina en el sujeto antes, durante o después de la administración. En algunas realizaciones, la cantidad de polipéptidos ERFE se mide con un ensayo utilizando una o más moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación y/o uno o más anticuerpos de la invención generados contra un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender administrar al sujeto uno o más polipéptidos +ERFE en los que la medición de hepcidina es superior a la normal o uno o más polipéptidos -ERFE en los que la medición de hepcidina es inferior a lo normal.

La presente divulgación está dirigida a un ensayo para detectar la presencia de y/o medir la cantidad de un polipéptido ERFE en una muestra que comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo generado contra un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación y luego detectar la presencia y/o medición de la cantidad de anticuerpos unidos.

En algunas realizaciones, la presente invención está dirigida a un equipo que comprende un anticuerpo generado contra un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación, o composición como se describe aquí empacada junto con un reactivo, un dispositivo, material de instrucción, o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la presente invención está dirigida a una estirpe celular de hibridoma que es capaz de expresar el anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación o se genera contra un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación.

En algunas realizaciones, la presente invención está dirigida a un complejo que comprende al menos un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación unido a un anticuerpo, en donde por lo menos un polipéptido y/o el anticuerpo se fabrica mediante técnicas recombinantes.

La presente divulgación está dirigida al uso de uno o más polipéptidos de acuerdo con la presente divulgación, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación, un anticuerpo generado contra un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación, o una composición que comprende uno o más de los polipéptidos, moléculas de ácido nucleico y anticuerpos para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad de metabolismo del hierro.

La presente invención está dirigida a un anticuerpo generado contra un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación, o una composición que comprende dichos anticuerpos para su uso en el tratamiento de una enfermedad de metabolismo del hierro.

Descripción detallada de la invención

Tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son solo ejemplos y explicaciones y pretenden proporcionar una explicación adicional de la invención según se reivindica. Los dibujos adjuntos se incluyen para proporcionar una comprensión adicional de la invención y se incorporan y constituyen parte de esta especificación, ilustran diversas realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

Descripción de los dibujos

Esta invención se entiende adicionalmente mediante referencia a los dibujos en los que:

Figura 1: el ARNm de Hamp hepático se suprime después de la estimulación eritropoyética (flebotomía (línea continua) o inyección de EPO (línea discontinua)) en relación con los animales no tratados. Se utilizaron ratones machos de 6 semanas de edad, n=4/grupo. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, mediante la prueba de la t de Student en comparación con animales no tratados.

Figura 2: Respuestas de voluntarios humanos saludables a EPO 5000 U dadas a las 9 AM del día 2 (Ashby 2010).

Las figuras 3A-3B: ERFE es un miembro de la superfamilia TNF- α . Figura 3A: Alineación de ratón (SEQ ID NO: 2) y una proteína ERFE humana (SEQ ID NO: 1). La secuencia resaltada es la SEQ ID NO: 16. Se realizaron alineamientos CLUSTAL de color del segmento terminal C de ERFE humano a otros miembros humanos de la familia TNF y variantes humanas de ERFE. Se encontró que las variantes humanas de ERFE difieren en la secuencia de señal. De esta forma,

los polipéptidos ERFE de acuerdo con la presente invención comprenden 90-100%, preferiblemente 95-100%, más preferiblemente 98-100%, y más preferiblemente 99-100% de identidad de secuencia con el segmento de terminal N como se establece en la SEQ ID NO: 16. Figura 3B: Un modelo estructural de ERFE basado en las similitudes con otros miembros de la superfamilia TNF α .

5 Figura 4: aumento de veces en el ARNm de Erfe de la médula ósea después de una flebotomía (línea continua) o inyección de EPO (línea discontinua) en comparación con ratones no tratados. Se utilizaron machos de seis semanas de edad, n=4/grupo. *p<0.001, **p<0.01 por prueba de t de Student en comparación con animales no tratados.

10 Figura 5: El ERFE humano es un transcrito de eritroide expresado al máximo en eritroblastos intermedios. La Figura 5A muestra la expresión relativa del ARNm de ERFE humano en diversos tejidos en orden de intensidad. El hígado y la médula ósea fetal, órganos que expresan el ARNm de ERFE humano a un alto nivel, contienen eritroblastos. La Figura 5B se basa en la Base de Datos de Maduración de Eritroblastos Humanos (Merryweather-Clarke 2011). Se muestra la expresión relativa de ARNm ERFE humano en la maduración de los eritroblastos humanos, que van desde eritroides de unidades formadoras de colonias (CFUE), una etapa muy temprana del desarrollo de eritroides, a través de proeritroblastos (Pro-E), eritroblastos intermedios (Int-E) hasta los eritroblastos tardíos (LateE).

15 Figura 6: Expresión del ARNm Erfe en eritroblastos de médula de ratón clasificados en estadios proeritroblasto (ProE) y eritroblasto EryA, B, C según el método de Socolovsky (Liu 2006). Las barras blancas representan la médula de ratones C57BL/6 15 horas después de la flebotomía de 0.5 ml; y las barras negras representan la médula de ratones de control no manipulados. Ratones machos de seis semanas de edad, n=3/grupo, *p<0.01 mediante prueba t.

20 Las figuras 7A-7C: Cambio en el ARNm Hamp en el hígado de ratones Erfe^{+/+}, Erfe^{+/-} y Erfe^{-/-} flebotomizados (etiquetados como WT (tipo silvestre, Figura 7A), HT (Heterocigoto, FIG. 7B), y KO (Knock Out, FIG. 7C)). n = 3 a 6 ratones por grupo. *p<0.001, **p<0.01 por prueba de t en comparación con controles no flebotomizados.

25 Figura 8: Los ratones deficientes en Erfe muestran una recuperación tardía de la anemia. (A y B) Los ratones con deficiencia de Erfe flebotomizados (línea continua) en comparación con los ratones de tipo silvestre (línea discontinua) mostraron una recuperación retrasada de la hemoglobina y una hemoglobina corpuscular media inferior (MCH). Los parámetros hematológicos (A, B) se compararon para cada medición entre WT (n=17) y KO (n=15) mediante la prueba t de Student. En ausencia de diferencias de género, los géneros se combinaron para cada parámetro. ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05.

30 Figuras 9A-9C: Figura 9A: células HEK293T transfectadas con 0.5 o 1 μ g de ADN plasmídico que codifica el ADNc Erfe de ratón fusionado a una etiqueta 6His terminal C. Western blot con anticuerpo anti-6His detecta Erfe predominantemente en el sobrenadante, lo que indica que Erfe se secreta masivamente. Figura 9B: Erfe secretado es N- y O-glucosilado. Figura 9C: el anticuerpo 2 anti-Erfe anti-ratón de conejo generado contra una secuencia peptídica interna, PSRVPAQEL (SEQ ID NO: 18) detecta la proteína recombinante en una transferencia Western, en donde +/- indica la transfección o no con el plásmido Erfe.

35 Figura 10: Erfe actúa directamente sobre el hígado para suprimir la hepcidina. (A, B, C) Se trataron seis ratones C57BL/6 macho por vía intraperitoneal con Erfe recombinante de ratón (2 μ g/g) o solución salina y se analizaron 15 horas más tarde. El ARNm de hepcidina hepática (A) y los niveles de hepcidina (B) fueron suprimidos significativamente por el tratamiento de Erfe a pesar de la respuesta inflamatoria indicada por un aumento en la expresión de ARNm Saa1 en el hígado (C). (D, E, F) Ocho machos C57BL/6 de 7 semanas de edad fueron transducidos con un lentivirus que codifica GFP o la secuencia de ADNc Erfe de ratón. (D) La expresión del ARNm Erfe aumentó ligeramente en el hígado de los ratones transducidos con el lentivirus Erfe (solo 2 veces más que el nivel inicial de la médula ósea en comparación con una regulación por aumento de 32 veces en la médula ósea de los ratones con estimulación eritropoyética), pero este aumento fue suficiente para reducir los niveles de mRNA de hepcidina hepática (E) y hepcidina (F) en suero. (G) Erfe de ratón recombinante es secretado por células HEK293T infectadas con el lentivirus Erfe, según lo detectado por Western blot con un anticuerpo anti-FLAG. (H) El tratamiento de hepatocitos primarios de ratón con sobrenadantes (50% v/v) de células de control o células HEK293T que sobreexpresan Erfe indicó que Erfe actúa directamente sobre el hígado para suprimir la expresión del ARNm de hepcidina. Se muestran medias \pm EEM de 3 experimentos independientes con 15 horas de tratamientos por triplicado. Se midieron los niveles de hepcidina (Hamp), amiloide 1 en suero (Saa1) y ARNm Erfe (Erfe) mediante qRT-PCR. Se muestran las medias \pm EEM de $-\Delta$ Ct (es decir, Ct Hprt-Ct Hamp, Saa1 o Erfe). Se midieron los niveles de hepcidina en suero (B, F) mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Se compararon los valores medios entre los ratones tratados y los ratones de control o entre los tratados con Erfe para controlar las muestras mediante la prueba t de Student. ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05.

40 Figura 11: Aumento de ARNm Erfe en la médula ósea y el bazo de ratones intermedios th3/+ de β -talasemia (thai) (n=4) en comparación con los ratones de tipo silvestre (WT) (n=5). Se utilizaron ratones machos de 6 meses de edad. *p=0.016, **p<0.001. Se utilizó Hprt como gen de referencia.

65 Figura 12: Dominios estructurales predichos de Erfe. SP = péptido de señal, NTD = dominios 1 y 2 de terminal N.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de una proteína, a la que se hace referencia aquí como "eritroferona". La eritroferona es la primera "hormona" identificada que media entre la producción de glóbulos rojos y la absorción y distribución de hierro en los sujetos. La eritroferona se fabrica en la médula de un sujeto y su producción aumenta considerablemente cuando se estimula la producción de glóbulos rojos, por ejemplo, después de hemorragia o durante la recuperación de la anemia. La eritroferona regula el suministro de hierro para satisfacer las necesidades de producción de glóbulos rojos en la médula. Específicamente, se encuentra que la eritroferona actúa sobre el hígado para suprimir la producción de la principal proteína reguladora del hierro, la hepcidina. De esta forma, la sobreproducción de eritroferona puede causar una sobrecarga de hierro en enfermedades como la β -talasemia y por lo tanto la eritroferona antagonista podría ser utilizada para el tratamiento de β -talasemia.

La eritroferona se descubrió en la búsqueda de un factor que suprima la expresión de hepcidina. La hepcidina, una hormona peptídica de 25 aminoácidos sintetizada por el hígado, es el regulador central de la homeostasis del hierro. Ver Ganz 2011. La hepcidina actúa al unirse a la ferroportina, un único exportador de hierro que conduce a su ubiquitinación, internalización y degradación en lisosomas. Cuando la ferroportina desaparece de las membranas celulares, se inhibe la absorción en la dieta y el hierro reciclado es secuestrado en los macrófagos, disminuyendo la disponibilidad de hierro para la eritropoyesis. En contraste, la hepcidina baja permite que la ferroportina permanezca activa en las células que exportan hierro al plasma, lo que hace que haya más hierro disponible para la síntesis de hemoglobina. El hierro, la inflamación o el estrés del RE estimulan la producción de hepcidina, mientras que la hipoxia, la deficiencia de hierro y el aumento de la actividad eritropoyética lo reprimen.

La hepcidina se suprime después de hemorragia o la administración de eritropoyetina (EPO). La hepcidina disminuye en la anemia causada por sangrado, hemólisis o deficiencia de hierro, o en anemias hereditarias con eritropoyesis ineficaz. El efecto supresor de la eritropoyesis en la hepcidina es particularmente prominente en enfermedades con eritropoyesis ineficaz, en donde los precursores de eritrocitos se expanden masivamente, pero en su mayoría experimentan apoptosis en la etapa de eritroblastos en lugar de madurar en eritrocitos. De esta forma, en ratones C57BL/6, se examinó el curso temporal del ARNm de hepcidina en respuesta a hemorragia (500 μ l) o inyección de EPO (200 U) y se observó una supresión significativa del ARNm de hepcidina hepática entre 9 y 15 horas. A las 12-15 horas después de estimulación eritropoyética, la inhibición fue máxima a aproximadamente 90% (Figura 1). El tiempo de respuesta es similar al de voluntarios humanos en los que ocurrió disminución entre 9-24 horas (Figura 2).

Estos datos in vivo sobre el curso temporal de la respuesta a hemorragia en ratones revelan que ni el ARNm de la proteína α (C/EBP α) del elemento central del factor de transcripción ni los niveles de proteína en el hígado cambian, a pesar de que existe una potente supresión observable de hepcidina. La supresión de la hepcidina tampoco se debe a la administración de EPO debido a la mayor utilización de hierro, ya que la disminución drástica de la hepcidina precede a cualquier cambio en la saturación de la transferrina u otros parámetros conocidos relacionados con el hierro (Figura 2). De esta forma, en respuesta a la anemia u otros estímulos hipóxicos, parece que niveles altos de EPO causan la supresión de la hepcidina de manera indirecta, al inducir la secreción de uno o más factores eritroides de la médula ósea que, a su vez, actúan sobre el hígado para suprimir la expresión de la hepcidina y aumentar el suministro de hierro a partir de la absorción en la dieta y la reserva. La supresión temprana de hepcidina después de la inyección de EPO puede hacer que haya más hierro disponible para la rápida absorción por los precursores de eritrocitos, y acelera la eritropoyesis.

Por lo tanto, se estudiaron los perfiles de expresión génica en la médula ósea en respuesta al sangrado (0-48 horas), utilizando perfiles de expresión basados en chips genéticos comercialmente disponibles (Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST Array). El perfil de expresión también se puede llevar a cabo mediante métodos alternativos que incluyen la secuenciación de ADNc de próxima generación denominada "RNA Seq" en la técnica. Entre las transcripciones específicas de eritroides cuya expresión es inducida antes de la supresión del ARNm de hepcidina y se mantiene en niveles altos antes de que el nivel de hepcidina volviera a la línea inicial normal, hay una transcripción huérfana previamente no caracterizada, incluida en varias bases de datos públicas de secuencias como Fam132b, que codifica una proteína secretada. Se encontró que el ARNm de Fam132b era altamente inducido dentro de las 4 horas posteriores al sangrado, antes de la supresión de la hepcidina. La eritroferona es una proteína codificada por el ARNm Fam132b.

Excepto cuando se hace referencia a "polipéptidos ERFE" (polipéptidos +ERFE y -ERFE) y "polinucleótidos ERFE", como se utiliza aquí, "ERFE" (mayúsculas y en cursiva) se refiere al gen humano que codifica eritroferona, "Erfe" (primera letra en mayúscula, y en cursiva) se refiere al gen de ratón que codifica la eritroferona, "ERFE" (todas las mayúsculas y no en cursiva) se refiere a la proteína humana eritroferona, y "Erfe" (primera letra en mayúscula, y no en cursiva) se refiere a la proteína del ratón eritroferona.

Eritroferona es un miembro de la superfamilia TNF α . La secuencia de aminoácidos de los homólogos de eritroferona se conserva bien a través de la evolución de los vertebrados, de tal manera que las proteínas humanas y de ratón son aproximadamente 71% idénticas (Figura 3A) y la mitad del terminal C es aproximadamente 44% idéntica al homólogo de pez cebra. El análisis del dominio indicó que Erfe es un miembro de la superfamilia TNF α con solo una similitud moderada con las citocinas conocidas. El ligando RANK y TNF α (RANKL) son los parientes más cercanos. La

búsqueda en las bases de datos genómicas y de ARNm identificó dos variantes de ERFE humano que difieren solo en la secuencia de señal. Queda por determinar si ambos se expresan en la médula y si las variantes dan lugar a proteínas con diferentes niveles de expresión o actividad biológica diferente. Mediante la transcripción inversa de ARNm de eritroblastos derivados de hígado fetal humano y la secuenciación de ADNc, se confirmaron los 220 aminoácidos de terminal C (destacados en la Figura 3A).

El modelado estructural de toda la proteína utilizando HHPredictB (Figura 3B) indica que la porción de terminal N de la proteína (izquierda) consiste en una secuencia de señal seguido por una región abierta con un segmento similar al colágeno y la porción terminal C es homóloga a TNF α /RANKL (derecha). Las similitudes con TNF α son notables ya que el TNF α suprime ARNm de hepcidina en cultivos de hepatocitos primarios. La similitud con TNF α predice una tendencia a formar multímeros.

La expresión de eritroferrona en la médula responde a la EPO. Utilizando qPCR, se confirmó la inducción de la expresión del ARNm de Erfe después de flebotomía en la médula ósea (Figura 4), así como también en el bazo (datos no mostrados), lo que apoya su participación en la eritropoyesis. La inyección de EPO en ratones conduce a una supresión de hepcidina comparable a la de los ratones flebotomizados, tanto en amplitud como en el transcurso del tiempo (Figura 1). De forma similar, la respuesta del ARNm de Erfe a EPO en la médula ósea y el bazo es similar a la causada por flebotomía, pero la estimulación de Erfe ocurre antes en los ratones inyectados con EPO (Figura 4). Esto es consistente con la acción de Erfe en la dirección descendente de secuencia de EPO en el modelo de flebotomía.

Eritroferrona es probablemente una eritroquina producida por eritroblastos. La búsqueda en las bases de datos de expresión génica reveló que el ERFE humano se expresa en gran medida en la médula ósea humana y en el hígado fetal (por ejemplo, Figura 5A), y en células CD34+ humanas diferenciadas "in vitro" alcanza la máxima expresión en eritroblastos intermedios, con aproximadamente 8 de incremento sobre CFU-E (Figura 5B). Esto sugiere que los eritroblastos son la principal fuente de eritroferrona. Esto se verificó directamente con la médula ósea de ratón ex vivo obtenida 15 horas después de 0.5 ml de flebotomía, que mostró un aumento masivo de la expresión de Erfe en los eritroblastos en comparación con los ratones de control, predominantemente en las etapas EryA y B (eritroblasto temprano e intermedio) (Figura 6, qRT-PCR, referencia Hprt). Debido a la abundancia relativa de la etapa EryB, estas células probablemente constituyen la fuente principal de Erfe en la médula.

Respuesta de la hepcidina a hemorragia en ratones Erfe knockout y Haploinsuficientes: Se pueden utilizar ratones Erfe^{-/-} en un fondo mixto Sv129/C57BL/6 (Fam132btm1Lex, Lexicon Pharmaceuticals), así como también los retrocruzados en el fondo C57BL/6 utilizando un retrocruzado acelerado asistido por marcador para analizar más a fondo los polipéptidos Erfe de acuerdo con la presente divulgación. En algunos experimentos, el fondo mixto Erfe^{-/-} y Erfe^{+/-} se compararon con sus compañeros de camada tipo silvestre (WT). Los knockouts de Erfe (KO) son viables, parecen fenotípicamente normales, tienen un estudio estandarizado completamente normal y muy extenso realizado para la base de datos de ratones Lexicon, y son fértiles. Los hemogramas completos realizados con un analizador de hematología automatizado (Hemavet 850; Drew Scientific, Oxford, CT) a las 6 semanas de edad (pero no a las 3 semanas, a las 12 semanas ni a los 6 meses) revelaron niveles reducidos de hemoglobina al inicio en animales con deficiencia de Erfe en comparación con los de tipo silvestre y heterocigotos. La edad de 6 semanas es la época de rápida expansión y crecimiento de las eritroides con alta demanda de hierro, similar a la eritropoyesis por tensión después de sangrado. Para comprobar si Erfe es un mediador crítico de la represión de la hepcidina por sangrado, Erfe^{-/-}, Erfe^{+/-} y Erfe^{+/+} los compañeros de camada fueron flebotomizados (500 μ L) y analizados 12, 15, 24 y 48 Horas después de la flebotomía (Figuras 7A-7C). Los ratones Erfe^{-/-} no lograron disminuir la expresión del ARNm de hepcidina hepática, lo que indica que Erfe es esencial para la supresión rápida de hepcidina después de hemorragia (Figuras 7A-7C). Los ratones haploinsuficientes mostraron solo una respuesta parcial a las 12-15 horas, lo que sugiere una respuesta dependiente de la dosis de hepcidina a Erfe.

Los ratones deficientes en Erfe mostraron una recuperación tardía de la anemia inducida por sangrado Erfe^{+/+} y Erfe^{-/-} de doce semanas de edad fueron flebotomizados y su recuperación fue monitoreada durante 9 días. Los ratones deficientes en Erfe mostraron una hemoglobina más baja y hemoglobina corpuscular media en comparación con los controles de tipo silvestre (Figura 8) y la recuperación de los ratones deficientes en Erfe de anemia inducida por hemorragia se retrasó durante varios días.

Producción y Análisis de Proteínas Recombinantes. Se construyeron plásmidos de expresión múltiple que codifican el cDNA de ERFE de ratón y humano con un Myc/Flag de terminal C, epitopo V5/His, Myc/His y Flag/His. La transferencia Western del HEK293T transfectado confirmó que se secreta la proteína (Figura 9A). El material se purificó mediante cromatografía de afinidad con etiqueta, se analizó en SDS-PAGE y se identificaron las bandas principales correspondientes a las detectadas por transferencia Western. La identidad de las bandas como Fam132b/Erfe se confirmó mediante análisis proteómico de fragmentos tripsinizados mediante HPLC-MS. De forma interesante, la forma secretada de Erfe tiene un peso molecular ligeramente más alto que la forma celular, y ambas proteínas tuvieron el doble del tamaño previsto, lo que indica una posible dimerización. La desglucosilación del producto secretado purificado indicó que Erfe está glucosilado en N y O (Figura 9B). Se pueden utilizar formas recombinantes de los polipéptidos de Erfe y Erfe para analizar sus actividades in vitro e in vivo. Se generaron anticuerpos generados contra Erfe y se pueden utilizar para la detección de proteínas endógenas (Figura 9C) y para determinar las concentraciones séricas de uno o más polipéptidos de ERFE en sujetos, por ejemplo, modelos de ratones y pacientes con trastornos

del hierro. En experimentos preliminares, se encontró que una variante de la estirpe celular HEK293 expresaba Erfe en niveles altos, pero no pudo secretarla, lo que indica que el evento de secreción puede ser específico del tipo de célula o dependiente de las características especializadas de la célula.

5 Para probar si la proteína eritroferrona secretada es un supresor de hepcidina, a ratones machos C57BL/6 se les inyectó Erfe recombinante de murino (2 µg/g). Se encontró que el ARNm de hepcidina y los niveles de proteína en suero se redujeron significativamente 15 horas después del tratamiento con Erfe en comparación con ratones inyectados con solución salina (Figuras 10A, 10B) a pesar de una respuesta inflamatoria sustancial activada por la proteína recombinante, como lo demuestra el aumento en la expresión del ARNm de Saa1 (Figura 10C). La inflamación aumentaría la expresión de hepcidina.

15 Para evitar el efecto inflamatorio agudo de la preparación de Erfe recombinante, se transdujeron ratones machos C57BL/6 con un vector con base en lentivíricos codifica Erfe. Tres semanas después, se observó un aumento moderado de ARNm de Erfe en el hígado (pero no en la médula ósea) de ratones tratados con lentivirus Erfe en comparación con ratones tratados con el lentivirus de control (Figura 10D). No obstante, el ARNm de hepcidina y los niveles en suero se redujeron significativamente 30 veces y 10 veces respectivamente (Figuras 10E, 10F), lo que sugiere que incluso una pequeña cantidad de Erfe en el hígado fue suficiente para ejercer su efecto inhibitorio sobre la transcripción de hepcidina. Por lo tanto, se probó si Erfe puede actuar directamente sobre el hígado para regular la hepcidina. Los hepatocitos primarios de ratones se trataron durante 15 horas con 50% (v/v) de sobrenadantes de HEK293T de control o HEK293T que sobreexpresan Erfe (Figura 10G), lo que resulta en una disminución de 4 veces en los niveles de mRNA de hepcidina en células tratadas con Erfe (Figura 10H). En conjunto, estos resultados muestran que la eritroferrona es un potente supresor de la hepcidina que puede actuar directamente sobre el hígado para reprimir la expresión del ARNm de hepcidina.

25 Preparación de anticuerpos. Para facilitar la detección y caracterización de la eritroferrona, se puede generar y utilizar una serie de anticuerpos dirigidos contra antígenos peptídicos en las formas murinas y humanas de eritroferrona y polipéptidos ERFE. Adicionalmente, los anticuerpos contra los epítomos internos y de terminal N de la eritroferrona y/o los polipéptidos ERFE se pueden utilizar en diversos ensayos y tratamientos de acuerdo con la presente invención.

30 Aumento masivo de Erfe en ratones talasémicos. La sobreproducción de eritroferrona puede contribuir con la sobrecarga de hierro de β-talasemia no transfundida. Utilizando un modelo de ratón Hbb^{th3/+} de β-talasemia (Gardenghi 2007), se demostró que el ARNm de Erfe aumenta considerablemente en la médula ósea de ratones Hbb^{th3/+} en comparación con los controles de tipo silvestre (Figura 11). La expresión neta de Erfe es incluso mayor en ratones Hbb^{th3/+} si se tiene en cuenta que tienen médula expandida y bazos 3× más grandes que los ratones de tipo silvestre.

35 Polipéptidos y Composiciones

La presente divulgación está dirigida a la eritroferrona y a sus análogos y fragmentos. Como se utiliza aquí, la eritroferrona (que incluye ERFE y Erfe) y sus análogos y fragmentos se denominan colectivamente aquí como "polipéptidos ERFE". Los polipéptidos ERFE pueden o no exhibir actividad eritroferrona. Como se utiliza aquí, "actividad eritroferrona" se refiere a la capacidad de la sustancia para reducir los niveles de ARNm de hepcidina hepática o hepcidina en suero en comparación con un control.

45 Como se utiliza aquí, los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se utilizan indistintamente para referirse a dos o más aminoácidos unidos entre sí. Los grupos o cadenas de abreviaturas de aminoácidos se utilizan para representar péptidos. Excepto cuando se indica específicamente, los péptidos se indican con el terminal N a la izquierda y la secuencia se escribe desde el terminal N hasta el terminal C.

50 Los polipéptidos ERFE de la presente divulgación se pueden hacer utilizando métodos conocidos en la técnica, que incluyen síntesis química, biosíntesis o síntesis in vitro utilizando métodos de ADN recombinante y síntesis en fase sólida. Véase, por ejemplo, Kelly & Winkler (1990) Genetic Engineering Principles and Methods, vol. 12, J. K. Setlow ed., Plenum Press, NY, pp. 1-19; Merrifield (1964) J Amer Chem Soc 85: 2149; Houghten (1985) PNAS USA 82: 5131-5135; y Stewart & Young (1984), Solid Phase Peptide Synthesis, 2ed. Pierce, Rockford, IL. Los polipéptidos ERFE de la presente divulgación se pueden purificar utilizando técnicas de purificación de proteínas conocidas en la técnica, tales como cromatografía líquida de alto desempeño de fase inversa (HPLC), cromatografía de intercambio iónico o de inmunofinidad, exclusión por tamaño o filtración, o electroforesis. Véase Olsnes y Pihl (1973) Biochem. 12 (16): 3121-3126; y Scopes (1982) Protein Purification, Springer-Verlag, NY.

60 Alternativamente, los polipéptidos ERFE de la presente divulgación se pueden preparar mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Por lo tanto, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos ERFE de la presente divulgación se contemplan aquí y en este documento se denominan "polinucleótidos ERFE".

65 Se pueden aislar los polinucleótidos ERFE. Como se utiliza aquí, los polinucleótidos "aislados" se refieren a polinucleótidos que se encuentran en un entorno diferente de aquel en el que se produce el polinucleótido de forma natural. Por ejemplo, un polinucleótido aislado es uno que no tiene las bases que normalmente flanquean los extremos 5' y/o 3' del polinucleótido tal como se encuentra en la naturaleza.

Los polipéptidos ERFE de la presente divulgación se purifican sustancialmente. Tal como se utiliza aquí, un compuesto "sustancialmente purificado" se refiere a un compuesto que se retira de su entorno natural y/o está por lo menos aproximadamente 60% libre, preferiblemente aproximadamente 75% libre, y más preferiblemente aproximadamente 90% libre, y más preferiblemente aproximadamente 95-100% libre de otros componentes macromoleculares o compuestos con los cuales el compuesto está asociado en naturaleza o por su síntesis.

Como se utiliza aquí, un compuesto "aislado" se refiere a un compuesto que está aislado de su entorno natural. Por ejemplo, un polipéptido aislado es uno que no tiene sus aminoácidos naturales, que corresponden al polipéptido de longitud completa, que flanquea el terminal N, el terminal C o ambos. Por ejemplo, un fragmento aislado de eritroferrona o un polipéptido ERFE se refiere a un polipéptido aislado que comprende algunos, pero no todos, los residuos de aminoácidos eritroferrona o el polipéptido ERFE, pero puede tener aminoácidos no naturales en su terminal N, terminal C, o ambos, es decir, diferentes aminoácidos que no tienen identidad con los aminoácidos en la posición correspondiente de la eritroferrona o el polipéptido ERFE.

Los polipéptidos ERFE de la presente divulgación se fabrican usando técnicas sintéticas y/o recombinantes.

Se proporcionan uno o más polipéptidos de ERFE, como se describe aquí, en la forma de una composición que comprende un portador adecuado para su propósito previsto. Las composiciones también pueden incluir uno o más ingredientes adicionales adecuados para su propósito previsto. Por ejemplo, para ensayos, las composiciones pueden comprender liposomas, niclosamida, agente de solubilización SL220 (NOF, Japón), Cremophor EL (Sigma), etanol y DMSO. Para el tratamiento de un trastorno de hierro, las composiciones pueden comprender diferentes potenciadores de la absorción e inhibidores de proteasa, micropartículas sólidas o nanopartículas para la encapsulación de péptidos (tales como quitosán e hidrogeles), conjugación macromolecular, lipidización y otras modificaciones químicas. Las composiciones de la presente divulgación comprenden uno o más polipéptidos de ERFE en una concentración que es mayor que la que se encuentra en sujetos normales.

Se pueden usar uno o más polipéptidos de ERFE de acuerdo con la presente invención o composiciones de los mismos para tratar enfermedades del metabolismo del hierro. Tal como se usa en el presente documento, una "enfermedad del metabolismo del hierro" incluye enfermedades en las que el metabolismo aberrante del hierro provoque directamente la enfermedad, o cuando los niveles de hierro en la sangre están desregulados, provocando la enfermedad, o donde la desregulación del hierro es una consecuencia de otra enfermedad, o donde las enfermedades se pueden tratar al modular los niveles de hierro, y similares. Más específicamente, una enfermedad del metabolismo del hierro de acuerdo con esta divulgación incluye enfermedades por sobrecarga de hierro, trastornos por deficiencia de hierro, trastornos de la biodistribución del hierro, otros trastornos del metabolismo del hierro y otros trastornos potencialmente relacionados con el metabolismo del hierro, etc. Las enfermedades del metabolismo del hierro incluyen hemocromatosis, hemocromatosis por mutación HFE, hemocromatosis por mutación ferroportina, hemocromatosis por mutación del receptor 2 de transferina, hemocromatosis de mutación hemojuvelina, hemocromatosis mutación hepcidina, hemocromatosis juvenil, hemocromatosis neonatal, deficiencia de hepcidina, sobrecarga de hierro transfusional, talasemia, talasemia intermedia, talasemia alfa, anemia sideroblástica, porfiria, porfiria cutánea tardía, sobrecarga de hierro africana, hiperferritinemia, deficiencia de ceruloplasmina, atranferrinemia, anemia diseritropoyética congénita, anemia por enfermedad crónica, anemia por inflamación, anemia por infección, anemia hipocromática microcítica, anemia por deficiencia de hierro, anemia por deficiencia de hierro refractaria al hierro, anemia por enfermedad renal crónica, resistencia a la eritropoyetina, deficiencia de hierro en la obesidad, otras anemias, tumores benignos o malignos que producen en exceso hepcidina o inducen su sobreproducción, afecciones con exceso de hepcidina, ataxia de Friedreich, síndrome gracile, enfermedad de Hallervorden-Spatz, enfermedad de Wilson, hemosiderosis pulmonar, carcinoma hepatocelular, cáncer, hepatitis, cirrosis hepática, insuficiencia renal crónica, resistencia a la insulina, diabetes, aterosclerosis, trastornos neurodegenerativos, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y Enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, la enfermedad por sobrecarga de hierro es el síndrome mielodisplásico. En algunos casos, las enfermedades y trastornos incluidos en la definición de "enfermedad del metabolismo del hierro" no suelen identificarse como relacionados con el hierro. Por ejemplo, la hepcidina se expresa en gran medida en el páncreas murino, lo que sugiere que la diabetes (Tipo I o Tipo II), la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa y otros trastornos pueden mejorarse tratando los trastornos subyacentes del metabolismo del hierro. Ver Ilyin, G. et al. (2003) FEBS Lett. 542 22-26.

Como tales, estas enfermedades están incluidas en la definición general. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente si una enfermedad dada es una "enfermedad o metabolismo del hierro" de acuerdo con la presente invención usando métodos conocidos en la técnica, incluidos los ensayos del documento WO 2004092405, y los ensayos, que monitorean los niveles y la expresión de hepcidina, hemojuvelina o hierro, que son conocidos en la técnica, tales como los descritos en la patente de EE.UU. No. 7,534,764. En algunas realizaciones de la presente invención, las enfermedades del metabolismo del hierro son enfermedades por sobrecarga de hierro, que incluyen hemocromatosis hereditaria, anemias de carga de hierro, enfermedades hepáticas alcohólicas y hepatitis C crónica.

Como se usa en el presente documento, las enfermedades y trastornos relacionados con el exceso de hepcidina incluyen anemia de la enfermedad crónica (también llamada anemia de inflamación), anemias asociadas con

infecciones agudas o crónicas, anemia de la enfermedad renal crónica, anemias debido a tumores que secretan hepcidina y anemia por deficiencia de hierro refractaria al hierro (IRIDA).

5 Como se usa en el presente documento, las enfermedades y trastornos relacionados con el déficit de hepcidina incluyen formas adultas y juveniles de hemocromatosis hereditaria, α -talasemia, β -talasemia y anemias diseritropoyéticas congénitas, y enfermedades hepáticas crónicas que incluyen enfermedad hepática alcohólica y hepatitis B crónica y C.

10 Como se usa en el presente documento, un "polipéptido +ERFE" se refiere a un polipéptido ERFE que exhibe una actividad eritroferona que es igual o similar a la de la eritroferona humana y/o de ratón. La eritroferona es un polipéptido +ERFE. Como se usa en el presente documento, un "polipéptido ERFE" se refiere a un polipéptido ERFE que no muestra actividad eritroferona y en algunas realizaciones interfiere con la actividad de polipéptidos +ERFE. La eritroferona no es un polipéptido ERFE. Por lo tanto, el término "polipéptidos ERFE" se utiliza para referirse tanto a los polipéptidos +ERFE como a los polipéptidos ERFE. En otras palabras, un polipéptido ERFE puede ser un
15 polipéptido +ERFE o un polipéptido -ERFE.

Polipéptidos y Tratamientos +ERFE

20 La presente divulgación se refiere a métodos para usar uno o más polipéptidos +ERFE solos o en combinación con uno o más agonistas de la eritroferona para tratar enfermedades y trastornos relacionados con el exceso de hepcidina y/o los déficits de hierro, por ejemplo, anemia por inflamación, y anemia por deficiencia de hierro refractaria al hierro (IRIDA). Los polipéptidos +ERFE de la presente invención imitan la acción de la eritroferona, es decir, exhiben la misma actividad o sustancialmente similar a la de la eritroferona. La presente invención se refiere a métodos de uso de uno o más polipéptidos +ERFE para inhibir, suprimir o reducir la expresión de hepcidina o prevenir la expresión
25 adicional de hepcidina.

Polipéptidos y Tratamientos -ERFE

30 La presente divulgación se refiere a métodos para usar uno o más polipéptidos -ERFE solos o en combinación con uno o más antagonistas de la eritroferona para tratar enfermedades y trastornos relacionados con los déficits de hepcidina y/o la sobrecarga de hierro. La presente divulgación está dirigida a usar uno o más polipéptidos -ERFE para aumentar la expresión y/o las cantidades de hepcidina. Los polipéptidos -ERFE incluyen aquellos que compiten competitivamente con la eritroferona por el receptor de la eritroferona, y aumentan la expresión de hepcidina y/o las cantidades de hepcidina. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la presente divulgación está dirigida a los métodos de
35 uso de uno o más polipéptidos -ERFE solos o en combinación con uno o más antagonistas de la eritroferona para tratar enfermedades y trastornos provocados por déficits de hepcidina, por ejemplo, β -talasemia o anemia congénita diseritropoyética, y toxicidad por hierro.

40 Por lo tanto, uno o más polipéptidos ERFE de la presente invención pueden administrarse a un sujeto, preferiblemente un mamífero tal como un humano.

45 Los polipéptidos ERFE se administran en forma de una composición farmacéutica. En algunas casos, los polipéptidos ERFE se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se usa en este documento, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad que mejora los síntomas y/o la patología de una enfermedad dada del metabolismo del hierro en comparación con un control como un placebo.

50 Una cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar fácilmente mediante métodos estándar conocidos en la técnica. Un experto en la técnica puede determinar las dosis que se administrarán, dependiendo de la gravedad clínica de la enfermedad, la edad y el peso del sujeto o la exposición del sujeto al hierro. Las cantidades efectivas preferidas de los compuestos de la invención varían de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal, y más preferiblemente de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal para formulaciones parenterales. Las cantidades efectivas preferidas para la administración oral serían hasta aproximadamente 10 veces más altas. Además, el
55 tratamiento de un sujeto con un polipéptido ERFE o composición de la presente invención puede incluir un tratamiento único o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. Se apreciará que las dosis reales variarán de acuerdo con el polipéptido o composición ERFE particular, la formulación particular, el modo de administración y el sitio particular, el huésped y la enfermedad que se está tratando. También se apreciará que la dosis efectiva utilizada para el tratamiento puede aumentar o disminuir en el transcurso de un tratamiento particular. Los expertos en la materia pueden determinar las dosis óptimas para un conjunto dado de condiciones utilizando pruebas de determinación de
60 dosis convencionales en vista de los datos experimentales para un polipéptido o composición ERFE dado. Los cambios en la dosificación pueden resultar y ser evidentes mediante ensayos de diagnóstico estándar conocidos en la técnica. En algunas condiciones puede ser necesaria la administración crónica.

65 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar en una forma de dosificación unitaria apropiada para el modo de administración deseado. Las composiciones de la presente invención pueden administrarse para terapia por cualquier vía adecuada que incluye oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal y

parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Se apreciará que la ruta preferida variará con la condición y la edad del receptor, la naturaleza de la afección a tratar, y el polipéptido y la composición ERFE elegidos.

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un polipéptido ERFE como se describe en el presente documento, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable inerte. Tal como se usa en el presente documento, la frase "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica y conocidos en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones.

15 Los compuestos activos suplementarios también pueden incorporarse en las composiciones. Los compuestos activos suplementarios incluyen niclosamida, liposomas, agente de solubilización SL220 (NOF, Japón), Cremophor EL (Sigma), etanol y DMSO.

20 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los polipéptidos ERFE y las composiciones de la presente invención se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren los polipéptidos ERFE que exhiben grandes índices terapéuticos. Si bien se pueden usar los polipéptidos ERFE que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de administración que dirija dichos polipéptidos ERFE al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

25 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosis para uso en humanos. La dosificación de los polipéptidos ERFE de la presente invención se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier polipéptido ERFE usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración circulante en plasma que incluya la IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición de los síntomas a mitad del máximo) determinada en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en los seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

40 La presente invención también proporciona kits que comprenden uno o más polipéptidos ERFE y/o composiciones de la presente invención envasados junto con reactivos, dispositivos, material de instrucción o una combinación de los mismos. Por ejemplo, los kits pueden incluir reactivos utilizados para realizar ensayos, fármacos y composiciones para diagnosticar, tratar o controlar trastornos del metabolismo del hierro, dispositivos para obtener muestras para analizar, dispositivos para mezclar reactivos y realizar ensayos, y similares.

45 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar la invención.

Experimentos

1. La función de la eritroferrona en la regulación del metabolismo del hierro dependiente de eritro

50 Producción de eritroferrona: los datos preliminares indican que el ARNm de Erfe aumentó mucho en la médula ósea y el bazo después de la hemorragia y la inyección de EPO. La médula ósea y los tipos de células esplénicas que expresan el transcrito de Erfe en condiciones normales y durante la eritropoyesis del estrés se identificaron de la siguiente manera: En pocas palabras, se aislaron las células totales de bazo y médula ósea de ratones control y ratones flebotomizados (15 horas) y se clasificaron por citometría de flujo en función de Los niveles de expresión de Ter119, CD71 y dispersión hacia adelante. Véase, por ejemplo, Socolovsky 2007; Chen 2009. La expresión de ARNm de Erfe se cuantificó mediante qPCR en cada población de células en relación con dos genes de mantenimiento. La expresión de Erfe aumentó masivamente en todas las etapas de eritroblastos después de la flebotomía en comparación con los ratones de control (FIG. 6) (ProE, EryA, B y C). Debido a la abundancia relativa de la etapa de EryB, estas células probablemente constituyen la principal fuente de eritroferrona en la médula. Para determinar si Erfe es realmente un producto específico para el eritroide, se puede realizar un análisis de qPCR de tejidos representativos de ratones al inicio y después de la flebotomía.

65 Células hematopoyéticas. Para examinar la contribución de las células hematopoyéticas a la producción de eritroferrona bioactiva, se puede realizar un trasplante recíproco de médula ósea entre ratones Erfe^{-/-} y Erfe^{+/+}, después de la irradiación mieloablativa, utilizando autotrasplantes como controles. Tales experimentos se pueden realizar de acuerdo con las directrices veterinarias recientes. Ver Duran-Struuck 2009. Después de dejar 3 semanas para la

recuperación eritropoyética y el cese de la reacción inflamatoria a la radiación y al trasplante, la supresión de la hepcidina 15 horas después de 500 µl de flebotomía puede usarse como lectura fenotípica. El predominio celular del injerto y del donante puede ser confirmado mediante la qPCR de la médula ósea para los alelos de Erfe intactos frente a los alterados, y la producción de Erfe se pueden evaluar mediante qRT-PCR (o ELISA, y similares). Se espera que el fenotipo sea transferido con la médula. En el improbable resultado alternativo, se pueden ensayar otros tipos de células como la fuente de eritroferona.

Regulación por la EPO - La EPO puede tener efectos duales en la expresión de la eritroferona: 1) aumenta el número de células (eritroblastos intermedios) que expresan la eritroferona al promover la supervivencia de los precursores a través de las etapas de eritroblastos proerythroblast-basophilic, o 2) puede regular directa o indirectamente concentraciones las concentraciones de ARNm de eritroferona. Debido a que Erfe está casi al máximo, 30 veces, aumentó ya 4 horas después de la inyección de EPO en ratones (Figura 4), momento en el cual el número de progenitores eritroides esplénicos o medulares aumenta solo ligeramente, el segundo mecanismo predomina y la respuesta a la EPO es probable que el eritroblasto sea autónomo. Sin embargo, la regulación por EPO se puede determinar por lo siguiente: En resumen, las células de médula ósea de ratón recién recolectadas se incuban durante 4 horas complementando el medio con concentraciones de EPO de 0-2.5 u/ml y luego clasificarán las células eritroides usando métodos conocidos en la técnica. Cada etapa de maduración eritroide se analizará mediante qRT-PCR para la expresión de Erfe en función de la dosis de EPO.

Debido a que la eritroferona no es necesaria para la eritropoyesis basal, se espera que la eritroferona esté regulada por la vía de estrés del receptor de EPO (EPOR). Stat5 es el principal factor de transcripción de la ruta EPO-EPOR/Jak2 para los genes activados por la eritropoyesis del estrés (Teglund 1998; Menon 2006) y el análisis de 3 kilobases del ratón y del promotor de eritroferona humana utilizando el software Genomatix mostró múltiples motivos de unión a GATA y elementos de unión Stat5 potenciales (u otros Stat). Por lo tanto, se puede verificar si la transcripción de Erfe está regulada por la ruta Stat de acuerdo con lo siguiente: Se cultivan precursores de eritroides de hígado fetal de ratón y de médula de ratón (England 2011), se tratan con concentraciones graduales de EPO durante 4 horas con o sin inhibidores de Stat5 (pimozida o N'-((4-oxo-4H-cromen-3-il)metileno)nicotinohidracida) y el efecto sobre los niveles de ARNm de Erfe se evalúa mediante qPCR. Si los eritroblastos toleran mal la breve exposición a los inhibidores de Stat5, se puede usar la estirpe celular UT7 que experimenta la diferenciación eritroide durante el tratamiento con EPO o la estirpe celular continua CD36E, una estirpe celular progenitora eritroide que posee la capacidad de producir hemoglobina (Wong 2010) o estirpe de células J2E (Greene 2002). Usando estas estirpes celulares y un promotor de Erfe, se realizó una mutagénesis dirigida al sitio de construcción de supuestos sitios de unión de Stat5 para probar el mecanismo por el cual la EPO regula el promotor de Erfe. Finalmente, si estos enfoques no tienen éxito en determinar si la vía STAT5 regula la expresión de Erfe, se pueden obtener ratones con EPOR-HM deficientes en la respuesta de STAT5 graduada y determinar si estos ratones regulan Erfe en respuesta a la EPO. Ver Porpiglia 2012. Aunque es menos probable, una o más rutas alternativas de señalización del receptor de EPO podrían ser más importantes que STAT5 en la regulación de Erfe. En general, estas rutas son menos conocidas, pero incluyen las rutas PI3-quinasa y MAP-quinasa, y están implicadas predominantemente en la regulación de la supervivencia y proliferación de eritroblastos. Ver Richmond 2005; Bouscary 2003.

Dependencia de la dosis de EPO-Las dosis terapéuticas de EPO disminuyen la concentración de hepcidina incluso en condiciones de producción de EPO endógena normal o aumentada, e incluso en caso de inflamación y sobrecarga de hierro. Ver Huang 2009. Este importante efecto de la EPO no se comprende, y es importante porque puede contribuir a su eficacia terapéutica en la anemia de la inflamación y en la anemia del cáncer, donde la hepcidina está elevada y el hierro es secuestrado en los macrófagos. Se puede determinar la dependencia de la dosis de la respuesta del ARNm de hepcidina hepática y la hepcidina sérica a dosis graduadas de EPO (inyección única, 0.2-200 U) en Erfe KO y animales heterocigotos en comparación con los controles WT. Como se muestra en los datos preliminares en ratones WT, la inyección de EPO tuvo un efecto idéntico a una flebotomía única en el transcurso del tiempo de la expresión del ARNm de hepcidina o Erfe, por lo que se espera que los ratones Erfe^{-/-} inyectados con EPO no logren suprimir la hepcidina de manera similar a la Erfe^{-/-} flebotomizada. Es posible que una vía alternativa que suprima la hepcidina se manifieste en ratones Erfe^{-/-} KO a concentraciones más altas de EPO. Aunque se informó un efecto directo de la EPO sobre la expresión de hepcidina (Pinto 2008), los autores de la presente invención no observaron dicha supresión en los experimentos. Si la EPO de dosis alta suprime la hepcidina en ratones Erfe^{-/-}, se puede reexaminar si las altas concentraciones de EPO pueden suprimir el ARNm de hepcidina en el hígado de manera indirecta, tal vez actuando sobre poblaciones de células no hepatocíticas que también se pueden mezclar en algunos cultivos de hepatocitos primarios.

Anemia por hemólisis. El modelo de hemólisis inducida por fenilhidracina se usa tradicionalmente para estudios de eritropoyesis por estrés en ratones, y la anemia está asociada con la supresión de hepcidina (Nicolas 2002). El modelo difiere de la anemia hemorrágica en que la recuperación depende del reciclaje de hemo y hierro. Se puede analizar el efecto de la ablación de Erfe sobre la recuperación de la anemia hemolítica aguda después de una dosis única de fenilhidracina 100 mg/kg (Lim 1998). Los ratones se analizarán los días 2, 4 y 6 para el hemograma completo, la maduración eritroide por citometría de flujo, la expresión de hepcidina y los parámetros de hierro. Se espera que la hepcidina no se suprima en los ratones Erfe^{-/-} y que tengan una recuperación retardada de la eritroides.

Absorción de hierro dietética compensatoria y liberación de hierro de las reservas: En los seres humanos, la absorción de hierro en la dieta representa menos del 10% del total de las necesidades diarias de hierro y la mayor parte del hierro se deriva de los macrófagos que reciclan eritrocitos senescentes. Sin embargo, en los ratones alimentados con concentrado estándar, la absorción en la dieta proporciona casi el 50% de la necesidad diaria total de hierro. Ver Ramos 2011. Por lo tanto, para diferenciar si la ablación de Erfe tiene efectos distintos sobre la utilización del hierro en la dieta versus el reciclado durante la recuperación de una hemorragia, las reservas de hierro en ratones y el contenido de hierro en la dieta pueden ser manipulados. Para evaluar el efecto sobre la deficiencia de Erfe en la absorción de hierro en la dieta, uno de ellos elimina las reservas de hierro al alimentar a los animales con una dieta de 4 ppm durante dos semanas. Una vez que las reservas de hierro son bajas, según lo confirmado por el análisis de referencia del hígado y el bazo en un subgrupo de ratones, otro grupo de animales son flebotomizados 500 μ l y se colocan en una dieta repleta de hierro (300 ppm). Para evaluar el efecto de Erfe en el reciclaje de hierro y la movilización de las reservas, los ratones se tratan previamente con dextrano de hierro para proporcionarles suficientes reservas de hierro para compensar la pérdida de sangre de 500 μ l (300 μ g de hierro), y una semana más tarde, se les realiza una flebotomización y se colocan en una dieta deficiente en hierro de 4 ppm. Se espera que la falta de supresión de hepcidina en ratones Erfe KO impida el aumento compensatorio tanto en la liberación de hierro almacenado como en la absorción de hierro de la dieta. Otros resultados plantearían la posibilidad de una regulación diferencial del transporte de hierro intestinal frente al macrófago según lo informado por otros (Chaston 2008) o rutas redundantes para su regulación.

Otra posible actividad: Es posible que Erfe ejerza alguna influencia en el entorno medular. Para detectar efectos principales, se puede comparar la morfología de las secciones de fémur en ratones con sobreexpresión de Erfe, Erfe^{-/-} y WT. Para la comparación del linaje eritroide en estos ratones, se puede analizar el bazo total y las células de la médula ósea por citometría de flujo en función de los niveles de expresión de c-kit, Ter119, CD71 y/o CD44. Ver Socolovsky 2007; Chen 2009.

2. Caracterización de la eritroferrona, su actividad y mecanismo de acción.

La masa y la composición de la eritroferrona, incluidas sus isoformas intracelulares y extracelulares, y realizan un análisis de eliminación de dominios para establecer sus componentes funcionales pueden caracterizarse. También se puede determinar si la eritroferrona se secreta en la circulación y si ejerce su efecto directamente sobre el hígado. Se pueden usar formas recombinantes y/o sintéticas de eritroferrona para examinar su efecto sobre la expresión de hepcidina in vivo e in vitro. El impacto de la eritroferrona en los precursores eritroides y su diferenciación se puede examinar, así como el receptor de la eritroferrona.

Características fisicoquímicas y de composición: se puede realizar una transfección transitoria a escala media de células HEK293T (Freestyle 293 Expression System, Invitrogen) con un plásmido que codifica una secuencia de ADNc de eritroferrona de ratón y humana fusionada con un FLAG terminal C y una etiqueta de 6-histidina. La expresión en células de mamíferos aumenta la probabilidad de que la proteína recombinante esté lo más cerca posible de la forma nativa. La forma intracelular de los lisados celulares y la forma secretada del medio pueden purificarse y analizarse. Basándose en la experiencia anterior, se prefiere la purificación en 2 etapas para obtener una proteína satisfactoriamente pura que pueda usarse para tratamientos in vivo e in vitro. Por lo tanto, la purificación inicial de la eritroferrona recombinante se puede realizar principalmente utilizando perlas de afinidad específicas para una de las etiquetas terminal C es y la purificación final se puede realizar mediante HPLC. Para protegerse contra la posible inhibición de la actividad durante la purificación o mediante etiquetas, también se puede probar la actividad de las fracciones parcialmente purificadas y de la proteína tratada para eliminar las etiquetas. La proteína purificada se puede caracterizar en cuanto al tamaño mediante cromatografía de permeación de gel y SDS-PAGE, y luego la secuencia se puede determinar mediante la degradación de Edman en el extremo de terminal N y mediante la escisión de endoproteasas y la fragmentación por espectrometría de masas. Usando transferencias de Western con anticuerpos contra la eritroferrona, se puede comparar el tamaño de la proteína recombinante con Erfe secretada por eritroblastos murinos estimulados con EPO en el cultivo.

Polipéptidos ERFE y Actividad— Se pueden analizar las formas funcionales y los dominios de los polipéptidos ERFE mediante dos enfoques complementarios. En el primero, ERFE soluble y derivado de células, parcial o completamente purificado, se analiza para determinar la bioactividad mediante inyección en ratones. En el segundo enfoque, los métodos de administración lentiviral se utilizan para estudiar las variantes de Erfe en las que la proteína se modifica para eliminar partes o la totalidad de sus dominios estructurales individuales. Inicialmente, se puede sustituir una secuencia de señal genérica y someter la proteína a un análisis de truncamiento de terminal N para eliminar el dominio de terminal N (NTD1) y/o el dominio de colágeno (FIG. 12) para determinar si estos son críticos para la actividad de Erfe in vivo. El dominio de terminal N 2 (NTD2) puede ser más difícil de eliminar completamente porque es probable que su Cys142 participe en el emparejamiento de disulfuro, pero al menos su mitad de terminal N se eliminará. Sobre la base de su homología con otras citoquinas, se espera que el terminal C similar a TNF sea el resto activo y que los otros dominios faciliten la síntesis, la secreción o una posible función alternativa como la señalización célula a célula de la forma asociada membrana de erfe. En ambos enfoques, la lectura 4-15 horas más tarde incluirá hepcidina sérica mediante un inmunoensayo y mediciones de qPCR de la expresión del ARNm de hepcidina en el hígado. Para evitar la interferencia de la señal de hierro fuerte que estimula la hepcidina cuando los ratones están en una dieta "estándar" (típicamente 270-300 ppm) que provoque una sobrecarga leve de hierro, los ratones pueden colocarse en niveles

bajos (4 ppm de Fe) o suficientes (50 ppm de Fe) Dieta de hierro durante 2 semanas antes de la inyección. Este precondicionamiento asegurará la capacidad de respuesta de la hepcidina a los estímulos positivos y negativos.

5 Maduración Eritroide. La eritroferrona también podría ejercer efectos sobre la expansión y la maduración eritroides, ya sea directamente o por medio de sus efectos sobre el suministro de hierro. Se demostró que la reposición de hierro después de la anemia por deficiencia de hierro aumenta las células eritroides nucleadas 2.5 veces, y los eritroblastos hasta 3.9 veces, lo que indica que la disponibilidad de hierro limita la expansión del eritroblasto. En estudios preliminares, se utilizó la citometría de flujo (marcadores Ter119, CD71, CD44) (Socolovsky 2007; Chen 2009) para analizar la maduración de eritroblastos en la médula ósea y el bazo de ratones de tipo silvestre, de tipo heterocigoto y de KO en comparación con ratones de la camada controles no tratados 72 horas después de la flebotomía, las células eritroides en ratones Erfe^{-/-} parecían ser menos maduras que en WT y heterocigotos, pero no se observaron más células muertas, lo que sugiere que Erfe no desempeña una función en la protección de los eritroblastos contra la apoptosis. Debido a que los ratones KO parecen tener relativamente menos precursores inmaduros (eritroblastos tempranos) y la apoptosis no parece estar alterada en los ratones Erfe KO, es posible que Erfe pueda desempeñar una función en la regulación de la proliferación y diferenciación progenitoras tempranas.

20 Se puede estudiar la función de la eritroferrona en la eritropoyesis mediante citometría de flujo de progenitores esplénicos y de médula ósea recolectados a diversos intervalos después de la exposición eritropoyética y los progenitores hepáticos fetales bien cultivados, comparando los ratones Erfe KO con los ratones WT. También se pueden estudiar los efectos de la eritroferrona inyectada en la eritropoyesis utilizando métodos similares en ratones tanto Erfe KO como WT. La diferenciación de los eritroblastos puede caracterizarse por la expresión de Ter119, CD71 y/o CD44. La señalización de apoptosis y la muerte celular pueden evaluarse mediante tinción con AnnexinV y 7-amino-actinomicina D (7-AAD), respectivamente.

25 Los tratamientos de Erfe in vivo seguidos por el análisis citométrico de flujo de los números de precursores eritroides y la distribución entre las etapas de maduración demostrarán cualquier efecto significativo de Erfe sobre la proliferación o maduración de los precursores eritroides. Sin embargo, no establecerán si los efectos están mediados por el hierro y la hepcidina o por el efecto directo de Erfe sobre los precursores de eritroides. Para responder a esta pregunta, se puede estudiar el efecto de Erfe agregado a los cultivos de precursores eritroides de hígado fetal donde el hierro (holotransferrina) está presente en el medio y las concentraciones de hepcidina son muy bajas. Se puede realizar un cultivo in vitro de 14.5-15.5 días de precursores de eritroides de hígado fetal de ratones WT y Erfe^{-/-} en presencia o ausencia de Erfe recombinante agregado. La maduración de los precursores eritroides se puede analizar mediante citometría de flujo como antes. En todos estos estudios, se pueden comparar las poblaciones de precursores o los índices de muerte celular/apoptosis entre los ratones Erfe KO y WT y entre las condiciones tratadas con Erfe- y simulado.

40 Receptores para ERFE. Sobre la base de la similitud de la eritroferrona con el TNF α , el receptor de eritroferrona puede pertenecer a la familia del receptor de TNF (TNFR). Varios receptores en esta familia son huérfanos, es decir, carecen de ligandos conocidos. Ver Bossen 2006. Por lo tanto, se puede seleccionar la biblioteca de expresión de la familia conocida de TNFR murina y humana mediante citometría de flujo. Las construcciones del receptor se pueden expresar de forma transitoria en células HEK293 (Bossen 2006) y se pueden teñir con la forma etiquetada con FLAG de eritroferrona murina o humana (Figura 10G), seguido de un anticuerpo biotinilado anti-FLAG M2 y estreptavidina acoplada a PE. Si ninguno de la familia TNFR conocida se une a la eritroferrona, se puede realizar un cribado robótico de alto rendimiento de todas las moléculas similares a receptores de un banco de expresión de ADNc de ratón y humano utilizando células adherentes en placas de 384 pocillos y microscopía fluorescente de alto rendimiento. Los aciertos pueden ser sometidos a confirmación de citometría de flujo. El patrón de expresión de todos los receptores identificados se puede analizar mediante el examen de las bases de datos de expresión de tejidos (por ejemplo, Nextbio Body Atlas) para confirmar que el receptor se expresa en el tejido objetivo de la eritroferrona (hepatocitos si el mediador actúa directamente), y para identificar posibles potenciales Tejido y dianas de órganos para eritroferrona. También se puede emprender un enfoque bioquímico para identificar proteínas que interactúan con la eritroferrona. La eritroferrona y/o los polipéptidos ERFE pueden inmovilizarse en perlas magnéticas y usarse para extraer cualquier proteína de unión de la membrana o lisados celulares de hepatocitos primarios de ratón (u otros tipos de células identificadas como dianas ERFE en estudios anteriores). El complejo se puede identificar usando HPLC-espectrometría de masas. Una vez que se identifica el receptor de eritroferrona, se puede usar su similitud con otros receptores (si los hay) para identificar sus posibles mecanismos de señalización.

3. Si la eritroferrona aumenta en los trastornos de sobrecarga de hierro asociados con la supresión con hepcidina

60 Las concentraciones de eritroferrona en voluntarios sanos y muestras de suero del paciente, así como en modelos de ratones, pueden analizarse para confirmar que la eritroferrona actúa como un supresor patológico de hepcidina en anemias con eritropoyesis inefectiva.

65 Concentraciones de eritroferrona normales y patológicas: Se pueden usar anticuerpos anti-eritroferrona dirigidos contra la eritroferrona y/o los polipéptidos ERFE para determinar las concentraciones normales y anormales de eritroferrona en los sujetos. Se encontró que los anticuerpos de Erfe anti-ratón contra dos epítomos diferentes de la proteína Erfe reaccionaban fuertemente con la proteína recombinante en transferencias de Western (Figura 9C). Los

ensayos ELISA pueden usarse para medir los niveles circulantes de ERFE en sujetos que incluyen sujetos normales y sujetos después de una flebotomía, anemia hemolítica o durante la recuperación de la anemia, y sujetos que padecen trastornos de hierro, incluida anemia por deficiencia de hierro y diversas formas de talasemia, incluida la talasemia intermedia.

5 Ablación de Eritroferrona. La hepcidina es deficiente en pacientes con talasemia intermedia (Papanikolaou 2005; Origa 2007) y esto explica por qué estos pacientes hiperabsorben el hierro de la dieta y desarrollan una sobrecarga de hierro incluso sin transfusiones de eritrocitos o cualquier otra fuente de hierro no dietético. Para explorar la función de la eritroferrona como un supresor de hepcidina patógeno en la β -talasemia, se pueden analizar los efectos de la ablación de Erfe sobre la expresión de hepcidina y la sobrecarga de hierro hepática en un modelo de ratón para la intermediación de talasemia, como $Hbb^{th3/+}$. El ratón $Hbb^{th3/+}$ es el más grave de los dos modelos disponibles de β -thalassemia intermedia, con niveles de Hb de 7 a 9 g/dL, concentraciones de EPO circulantes incrementadas de 5 a 10 veces y eritropoyesis inefectiva que incluye sitios extramedulares. Presenta hepcidina baja, pero eventualmente se eleva a niveles "normales" a medida que la sobrecarga hepática de hierro aumenta de 3 a 5 veces la de los controles de tensión a los 6 meses de edad. Ver Gardenghi 2007; Nai 2012.

Por ejemplo, los niveles de Erfe se midieron en ratones $Hbb^{th3/+}$ de 6 meses y sus controles de la cepa WT para determinar si los niveles altos de Erfe podrían ser responsables de los niveles inadecuadamente bajos de hepcidina. Se demostró que el ARNm de Erfe aumentó considerablemente en la médula ósea y el bazo de los ratones $Hbb^{th3/+}$ en comparación con los ratones WT (Figura 11). Para probar si el aumento de Erfe es responsable de la sobrecarga de hierro observada en este modelo, se puede determinar el efecto de la ablación de la expresión de Erfe. El gen Erfe se encuentra en el cromosoma 1 del ratón y el gen de la globina beta en el cromosoma 7 del ratón y, por lo tanto, se pueden generar ratones $Erfe^{-/-} Hbb^{th3/+}$ mediante la reproducción como se hizo para otros genes en los ratones intermedios con talasemia. Ver Nai 2012; Gardenghi 2010. Los ratones $Hbb^{th3/+}$ con fondo C57B/6J pueden obtenerse de Jackson Labs (B6.129P2-Hbb-b1tm1Unc Hbb-b2tm1Unc/J, número de reserva, 002683).

Referencias

- Ashby, D.R., et al. (2010). Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica* 95, 505-508.
- Bossen, C., et al. (2006). Interactions of Tumor Necrosis Factor (TNF) and TNF Receptor Family Members in the Mouse and Human. *J. Biol. Chem.* 281, 13964-13971.
- Bouscary, D., et al. (2003). Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood* 101, 3436-3443.
- 35 Bramey, T., et al. (2009). No evidence for protective erythropoietin alpha signalling in rat hepatocytes. *BMC Gastroenterology* 9, 26.
- Casanovas, et al. (2013) The murine growth differentiation factor 15 is not essential for systemic iron homeostasis in phlebotomized mice. *Haematologica*. 98(3) :444-447.
- Centis, F., et al. (2000). The importance of erythroid expansion in determining the extent of apoptosis in erythroid precursors in patients with α -thalassemia major. *Blood* 96, 3624-3629.
- 40 Chaston, T., et al. (2008). Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells. *Gut* 57, 374-382.
- Chen, K., et al. (2009). Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *PNAS USA* 106, 17413-17418.
- 45 Clark, R.J., et al. (2011). Understanding the structure/activity relationships of the iron regulatory peptide hepcidin. *Chem. Biol* 18, 336-343.
- Duran-Struuck and Dysko (2009). Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies. *J Am. Assoc. Lab. Anim Sci* 48, 11-22.
- England, S.J., et al. (2011). Immature erythroblasts with extensive ex vivo self-renewal capacity emerge from the early mammalian fetus. *Blood* 117, 2708-2717.
- 50 Fernandes, A., et al. (2009). The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. *Blood* 114, 437-443.
- Finch, C. (1994). Regulators of iron balance in humans. *Blood* 84, 1697-1702.
- Ganz and Nemeth (2011). Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu. Rev. Med.* 62, 347-360.
- 55 Ganz and Nemeth (2012). Iron metabolism: interactions with normal and disordered erythropoiesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a011668.
- Ganz, T., et al. Mini-Hepcidin Peptides and Methods of Using thereof. Patent Application. US 2012/0040894 A1. 6-10-2010.
- Ganz, T., et al. (2008). Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood* 112, 4292-4297.
- 60 Gardenghi, S., et al. (2010). Hepcidin as a therapeutic tool to limit iron overload and improve anemia in betathalassemic mice. *J Clin. Invest* 120, 4466-4477.
- Gardenghi, S., et al. (2007). Ineffective erythropoiesis in α -thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. *Blood* 109, 5027-5035.
- Ghoti, H., et al. (2011). Increased serum hepcidin levels during treatment with deferasirox in iron-overloaded patients with myelodysplastic syndrome. *Br. J Haematol.* 153, 118-120.
- 65 Goodnough, J.B., et al. (2012). Inhibition of hepcidin transcription by growth factors. *Hepatology* 56, 291-299.

- Greene, W.K., et al. (2002). Enforced expression of HOX11 is associated with an immature phenotype in J2E erythroid cells. *Br. J. Haematol* 118, 909-917.
- Horiuchi, T., et al. (2010). Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 49, 1215-1228.
- 5 Hrinđa and Goldwasser (1969). On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. VI. Induced accumulation of iron by marrow cells. *Biochim. Biophys. Acta* 195, 165-175.
- Huang, H., et al. (2009). Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli. *Blood*. 113(15): 3593-3599.
- Karur, V.G., et al. (2006). Lyn kinase promotes erythroblast expansion and late-stage development. *Blood* 108, 1524-1532.
- 10 Kattamis, A., et al. (2006). The effects of erythropoietic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major. *Haematologica* 91, 809-812.
- Kimura, H., et al. (1986). Hematopoiesis in the rat: Quantitation of hematopoietic progenitors and the response to iron deficiency anemia. *J. Cell. Physiol.* 126, 298-306.
- 15 Lim, S.K., et al. (1998). Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis. *Blood* 92, 1870-1877.
- Liu, Y., et al. (2006). Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood* 108, 123-133.
- Maes, K., et al. (2010). In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenetic protein 2. *Blood* 116, 3635-3644.
- 20 Mastrogiannaki, M., et al. (2011). Hepatic HIF-2 down-regulates hepcidin expression in mice through epo-mediated increase in erythropoiesis. *Haematologica*.
- Menon, M.P., et al. (2006). Signals for stress erythropoiesis are integrated via an erythropoietin receptor-phosphotyrosine-343-Stat5 axis. *J Clin Invest* 116, 683-694.
- Merryweather-Clarke, A.T., et al. (2011). Global gene expression analysis of human erythroid progenitors. *Blood* 117, e96-e108.
- 25 Nai, A., et al. (2012). Deletion of Tmprss6 attenuates the phenotype in a mouse model of beta-thalassemia. *Blood* 119, 5021-5029.
- Nemeth, E., et al. (2006). The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood* 107, 328-333.
- 30 Nemeth, E., et al. (2004a). IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin. Invest* 113, 1271-1276.
- Nemeth, E., et al. (2005). Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood* 105, 1803-1806.
- Nemeth, E., et al. (2004b). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306, 2090-2093.
- 35 Nemeth, E., et al. (2003). Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 101, 2461-2463.
- Nicolas, G., et al. (2002). The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin. Invest* 110, 1037-1044.
- 40 Origa, R., et al. (2007). Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia. *Haematologica* 92, 583-588.
- Pak, M., et al. (2006). Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 108, 3730-3735.
- Papanikolaou, G., et al. (2005). Hepcidin in iron overload disorders. *Blood* 105, 4103-4105.
- Park, C.H., et al. (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* 276, 7806-7810.
- 45 Pinto, J.P., et al. (2008). Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBP α . *Blood* 111, 5727-5733.
- Pippard, M.J., et al. (1979). IRON ABSORPTION AND LOADING IN [beta]-THALASSEMIA INTERMEDIA. *The Lancet* 314, 819-821.
- Porpiglia, E., et al. (2012). Stat5 Signaling Specifies Basal versus Stress Erythropoietic Responses through Distinct Binary and Graded Dynamic Modalities. *PLoS Biol* 10, e1001383.
- 50 Preza, G.C., et al. (2011). Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. *J Clin. Invest* 121, 4880-4888.
- Qiao, B., et al. (2012). Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab* 15, 918-924.
- 55 Ramos, E., et al. (2011). Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology* 53, 1333-1341.
- Ramos, E., et al. (2012). Minihepcidins prevent iron overload in a hepcidin-deficient mouse model of severe hemochromatosis. *Blood*. 120(18): 3829-3836.
- Ramos, P., et al. (2010). Iron metabolism and ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia mouse models. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1202, 24-30.
- 60 Ravasi, G., et al. (2012). Hepcidin expression in iron overload diseases is variably modulated by circulating factors. *PLoS ONE*. 7, e36425.
- Richmond, Terri D., et al. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends in Cell Biology* 15[3], 146-155. 3-1-2005.
- 65 Rivera, S., et al. (2005a). Hepcidin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia. *Blood* 105, 1797-1802.

Rivera, S., et al. (2005b). Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferrremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood* 106, 2196-2199.

Sadahira, Y., et al. (2000). Impaired splenic erythropoiesis in phlebotomized mice injected with CL2MDP-liposome: an experimental model for studying the role of stromal macrophages in erythropoiesis. *J Leukoc Biol* 68, 464-470.

5 Seldin, M.M., et al. (2012). Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis. *J. Biol. Chem.* 287, 11968-11980.

Sham, R.L., et al. (2009). Hereditary hemochromatosis due to resistance to hepcidin: high hepcidin concentrations in a family with C326S ferroportin mutation. *Blood* 114, 493-494.

Socolovsky, M. (2007). Molecular insights into stress erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 14, 215-224.

10 Tanno, T., et al. (2007). High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat. Med.* 13, 1096-1101.

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

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

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

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

20 Vokurka, M., et al. (2006). Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res.* 55, 667-674.

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

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

Habiendo descrito de este modo realizaciones ejemplares de la presente invención, los expertos en la técnica deberían observar que las descripciones internas son solo ejemplares y que se pueden realizar varias otras alternativas, adaptaciones y modificaciones dentro del alcance de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención no está limitada a las realizaciones específicas como se ilustra en este documento, sino que está limitada únicamente por las siguientes reivindicaciones.

30

Lista de secuencias

- 35 <110> Los Regentes de la Universidad de California
 <120> Polipéptidos ERFE y eritroferrona y métodos de regulación del metabolismo del hierro
 <130> 034044.119WO1
 <150> 61/721,322
 <151> 2012-11-01
 40 <160> 18
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 354
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 1

ES 2 731 609 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 731 609 T3

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

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

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

Arg Leu Arg Arg Asp Ala Leu Val Glu Arg Arg Ala Leu His Glu Leu
 210 215 220

Gly Val Tyr Tyr Leu Pro Asp Ala Glu Gly Ala Phe Arg Arg Gly Pro
 225 230 235 240

Gly Leu Asn Leu Thr Ser Gly Gln Tyr Arg Ala Pro Val Ala Gly Phe
 245 250 255

Tyr Ala Leu Ala Ala Thr Leu His Val Ala Leu Gly Glu Pro Pro Arg
 260 265 270

Arg Gly Pro Pro Arg Pro Arg Asp His Leu Arg Leu Leu Ile Cys Ile
 275 280 285

Gln Ser Arg Cys Gln Arg Asn Ala Ser Leu Glu Ala Ile Met Gly Leu
 290 295 300

Glu Ser Ser Ser Glu Leu Phe Thr Ile Ser Val Asn Gly Val Leu Tyr
 305 310 315 320

Leu Gln Met Gly Gln Trp Thr Ser Val Phe Leu Asp Asn Ala Ser Gly
 325 330 335

Cys Ser Leu Thr Val Arg Ser Gly Ser His Phe Ser Ala Val Leu Leu
 340 345 350

Gly Val

<210> 2
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2

5

Met Ala Ser Thr Arg Arg Pro Val Gly Ala Arg Thr Leu Leu Ala Cys
 1 5 10 15

10

ES 2 731 609 T3

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

Pro Val Gly Thr His Ala Arg Pro Gln Pro Pro Gly Ala Glu Leu Pro
 35 40 45

Ala Pro Pro Ala Asn Ser Pro Pro Glu Pro Thr Ile Ala His Ala His
 50 55 60

Ser Val Asp Pro Arg Asp Ala Trp Met Leu Phe Val Lys Gln Ser Asp
 65 70 75 80

Lys Gly Ile Asn Ser Lys Arg Arg Ser Lys Ala Arg Arg Leu Lys Leu
 85 90 95

Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly
 100 105 110

Pro Phe Ile Pro Ser Glu Val Leu Leu Lys Glu Phe Gln Leu Leu Leu
 115 120 125

Lys Gly Ala Val Arg Gln Arg Glu Ser His Leu Glu His Cys Thr Arg
 130 135 140

Asp Leu Thr Thr Pro Ala Ser Gly Ser Pro Ser Arg Val Pro Ala Ala
 145 150 155 160

Gln Glu Leu Asp Ser Gln Asp Pro Gly Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 165 170 175

Ala Thr Leu Ala Gln Gly Pro Arg Ala Pro Arg Val Glu Ala Ala Phe
 180 185 190

His Cys Arg Leu Arg Arg Asp Val Gln Val Asp Arg Arg Ala Leu His
 195 200 205

Glu Leu Gly Ile Tyr Tyr Leu Pro Glu Val Glu Gly Ala Phe His Arg
 210 215 220

Gly Pro Gly Leu Asn Leu Thr Ser Gly Gln Tyr Thr Ala Pro Val Ala
 225 230 235 240

Gly Phe Tyr Ala Leu Ala Ala Thr Leu His Val Ala Leu Thr Glu Gln
 245 250 255

Pro Arg Lys Gly Pro Thr Arg Pro Arg Asp Arg Leu Arg Leu Leu Ile
 260 265 270

ES 2 731 609 T3

Cys Ile Gln Ser Leu Cys Gln His Asn Ala Ser Leu Glu Thr Val Met
 275 280 285

Gly Leu Glu Asn Ser Ser Glu Leu Phe Thr Ile Ser Val Asn Gly Val
 290 295 300

Leu Tyr Leu Gln Ala Gly His Tyr Thr Ser Val Phe Leu Asp Asn Ala
 305 310 315 320

Ser Gly Ser Ser Leu Thr Val Arg Ser Gly Ser His Phe Ser Ala Ile
 325 330 335

Leu Leu Gly Leu
 340

<210> 3
 <211> 17
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético basado en secuencias de Homo sapiens y Mus musculus.
 <400> 3

Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly
 1 5 10 15

Pro

<210> 4
 <211> 14
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético basado en secuencias de Homo sapiens y Mus musculus.
 <400> 4

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

<210> 5
 <211> 22
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético basado en secuencias de Homo sapiens y Mus musculus.
 <220>

30 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural
 <220>

35 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural
 <400> 5

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

Ser Asp Lys Gly Xaa Asn
 20

<210> 6
 <211> 17

ES 2 731 609 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético basado en secuencias de Homo sapiens y Mus musculus.
 5 <400> 6

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

Glu

<210> 7
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético basado en secuencias de Homo sapiens y Mus musculus.
 15 <400> 7

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

<210> 8
 20 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético basado en secuencias de Homo sapiens y Mus musculus.
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural
 <220>

35 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural
 <400> 8

Val Xaa Arg Arg Ala Leu His Glu Leu Gly Xaa Tyr Tyr Leu Pro Xaa
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético basado en secuencias de Homo sapiens y Mus musculus.
 <400> 9

Gly Leu Asn Leu Thr Ser Gly Gln Tyr
 1 5

50 <210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético basado en secuencias de Homo sapiens y Mus musculus.
 <400> 10

ES 2 731 609 T3

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

Leu

- <210> 11
- <211> 22
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Péptido sintético basado en secuencias de Homo sapiens y Mus musculus.
- <220>
- 10 <221> misc_feature
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural
- <220>
- <221> misc_feature
- 15 <222> (6)..(6)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural
- <400> 11

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

Gly Val Leu Tyr Leu Gln
 20

- <210> 12
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
- <223> Péptido sintético basado en secuencias de Homo sapiens y Mus musculus.
- <400> 12

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

- <210> 13
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
- <223> Péptido sintético basado en secuencias de Homo sapiens y Mus musculus.
- <400> 13

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

- <210> 14
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
- <223> Péptido sintético basado en secuencias de Homo sapiens y Mus musculus.
- <400> 14

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

- <210> 15
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 55 <220>
- <223> Péptido sintético basado en secuencias de Homo sapiens y Mus musculus.
- <220>

<221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural
 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural
 <400> 15

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

10 Xaa

<210> 16
 <211> 220
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

20

ES 2 731 609 T3

<210> 17
 <211> 134
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 17

```

Met Ala Pro Ala Arg Arg Pro Ala Gly Ala Arg Leu Leu Leu Val Tyr
 1                               5                               10
Ala Gly Leu Leu Ala Ala Ala Ala Ala Gly Leu Gly Ser Pro Glu Pro
 20                               25                               30
Gly Ala Pro Ser Arg Ser Arg Ala Arg Arg Glu Pro Pro Pro Gly Asn
 35                               40                               45
Glu Leu Pro Arg Gly Pro Gly Glu Ser Arg Ala Gly Pro Ala Ala Arg
 50                               55                               60
Pro Pro Glu Pro Thr Ala Glu Arg Ala His Ser Val Asp Pro Arg Asp
 65                               70                               75                               80
Ala Trp Met Leu Phe Val Arg Gln Ser Asp Lys Gly Val Asn Gly Lys
 85                               90                               95
Lys Arg Ser Arg Gly Lys Ala Lys Lys Leu Lys Phe Gly Leu Pro Gly
 100                               105                               110
Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ile Ile Pro
 115                               120                               125
Pro Glu Ala Leu Leu Lys
 130
    
```

10

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético basado en secuencias de Homo sapiens y Mus musculus.
 <400> 18

20

```

Pro Ser Arg Val Pro Ala Ala Gln Glu Leu
 1                               5                               10
    
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente un polipéptido ERFE o una composición del mismo para uso en el tratamiento una enfermedad de sobrecarga de hierro y/o trastorno asociado con niveles anormalmente bajos de hepcidina, en el que el polipéptido ERFE comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de al menos una de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12-14, AHSVDPRDAWMLFVX₁QSDKGX₂N (SEQ ID NO: 5) en donde X₁ es R y X₂, es V; VX₁RRALHELGX₂YYLPX₃ (SEQ ID NO: 8) donde X₁ es E, X₂, es V y X₃, es D; X₁MGLE X₂SSELF₁TISVNGVLYLQ (SEQ ID NO: 11) en donde X₁ es I y X₂, es S; y SLTVRSGSHFSAX₁LLGX₂ (SEQ ID NO: 15) en donde X₁ es V y X₂, es V, en el que la enfermedad de sobrecarga de hierro y/o el trastorno asociado con niveles anormalmente bajos de hepcidina se seleccionan del grupo que consiste en: síndromes mielodisplásicos, hemocromatosis hereditaria, anemias por carga de hierro, hepatopatías alcohólicas, hepatitis C crónica, alfa-talasemia, beta-talasemia, anemias diseritropoyéticas congénitas y hepatitis B crónica.
- 10
- 15 2. El anticuerpo monoclonal o una composición del mismo para el uso de la reivindicación 1, en el que la composición comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 20 3. El anticuerpo monoclonal o una composición del mismo para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo monoclonal se genera contra un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

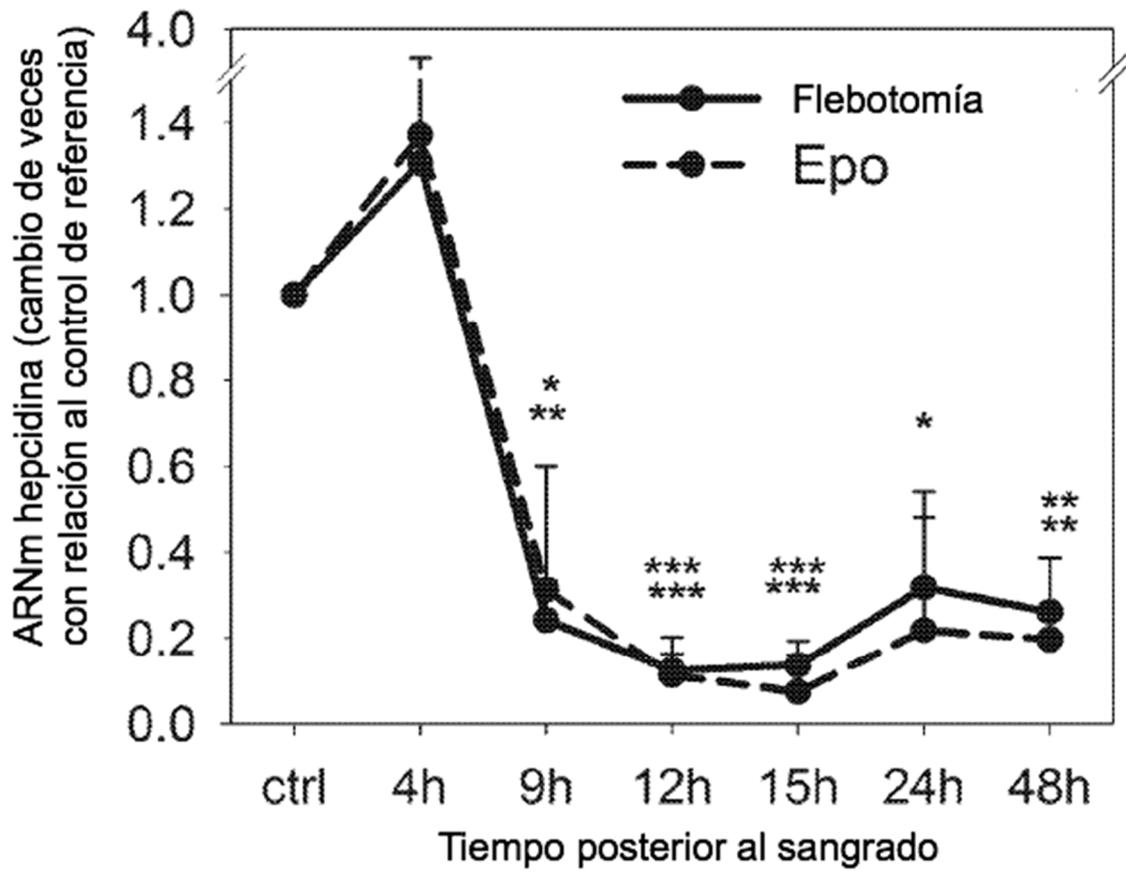


Figura 1

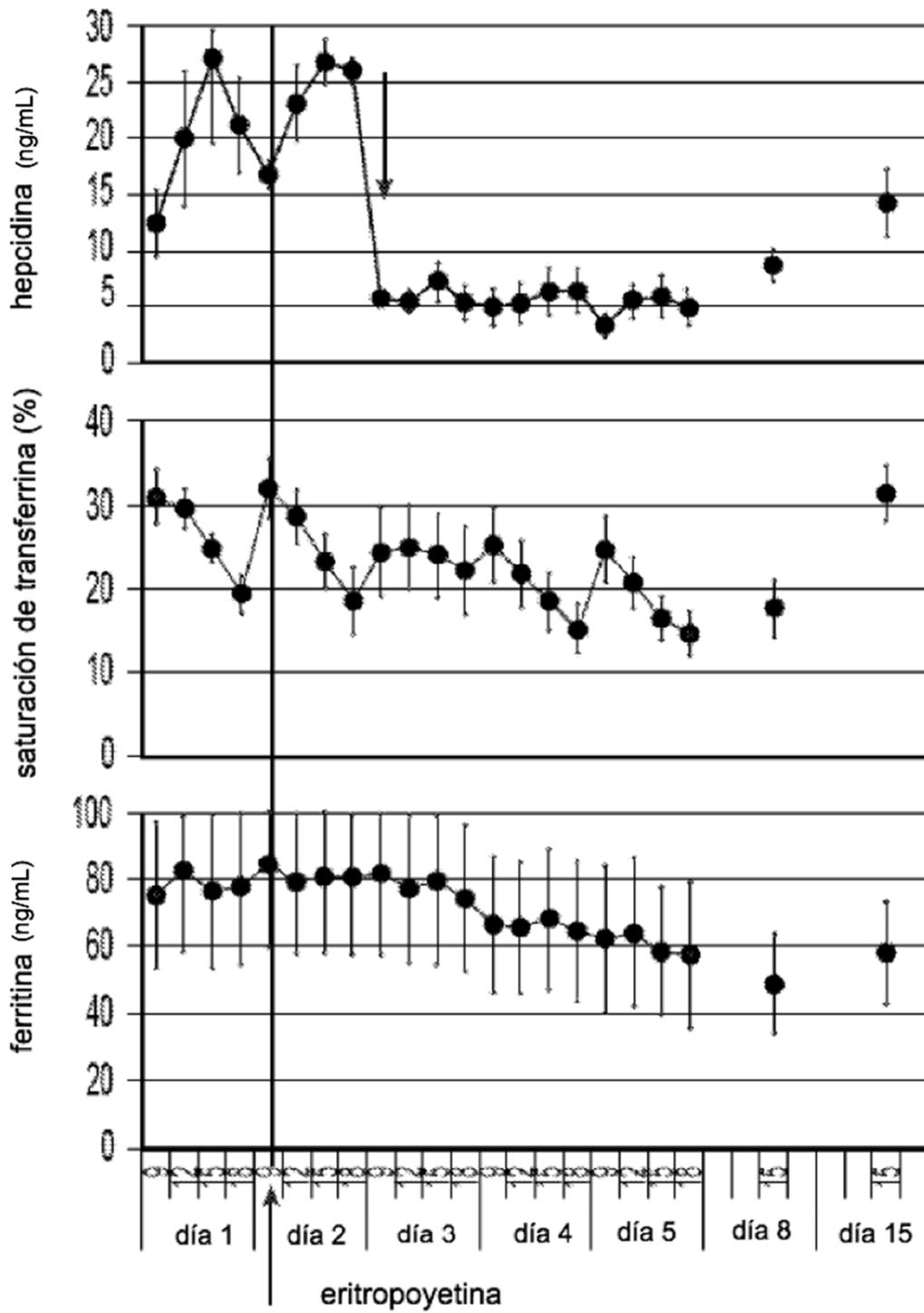


Figura 2

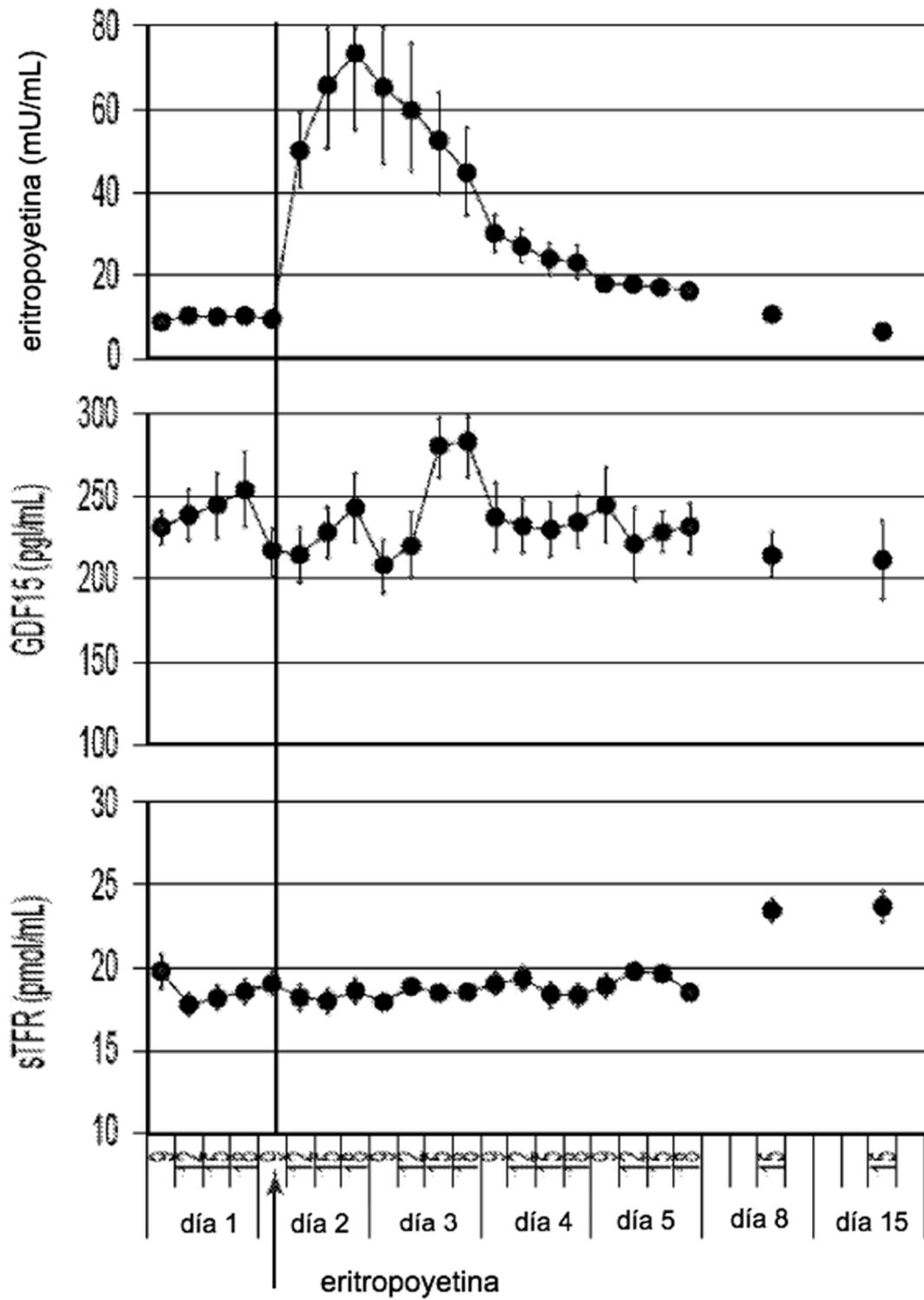


Figura 2 cont.

ES 2 731 609 T3

```

1  MAPARRPAGARLLLVIYAGLLAAAAAGLGSPEPGAPSRSRARREPPPGNELPRGPGESRAG 60 Q4G0M1 F132B_HUMANO
1  MASTRRPVGARTLLACASLLAA--MGLGVPEAEFVVGTHARP-QPPGAELPA-----P 50 Q6PGN1 F132B_RATÓN
  ** ***** :*****;*****;*:* ** **;*:*****
61  PAARPEPTAERAHSVDPDRAWMLFVRQSDKGVNGKKRSRGKAKKLFGLPGPPGPPGPQ 120 Q4G0M1 F132B_HUMANO
51  PANSPPPEPTIAHAHSVDPDRAWMLFVKQSDKGINSKRRS--KARRLKLGLPGPPGPPGPQ 108 Q6PGN1 F132B_RATÓN
  *****:* * ,***** ***** * ** :*.:* : * :* * *.:
121  GPPGPIIPPEALLKEFQLLLKGAVRQERAEPEPCTCGPAGPVAASLAPVSATAGEDDDD 180 Q4G0M1 F132B_HUMANO
109  GPPGPFIPSEVLLKEFQLLLKGAVRQRESH-LEHCTRDLTTPASGSPSRVP-AAQELDSQ 166 Q6PGN1 F132B_RATÓN
  * :***** ** ***** ***** . * :*****;*****;****:*
181  VVDVLLALLAAPLAPGRAPRVEAAFLCRLRRDALVERRALHELGVVYLPDAEGAFRRGP 240 Q4G0M1 F132B_HUMANO
167  DPGALLALLAATLAQGRAPRVEAAFHCLRRDVQDRRALHELGIYYLPEVEGAFRRGP 226 Q6PGN1 F132B_RATÓN
  ***** ***** * **:* ** **;***** **;*****;
241  GLNLTSGQYRAPVAGFYALAATLHVALGEPRRGPPRRDHLRLLLICIQSRCQRNASLEA 300 Q4G0M1 F132B_HUMANO
227  GLNLTSGQYTAPVAGFYALAATLHVALTEQPRKGPTRPRDRLRLLLICIQSLCQHNASLET 286 Q6PGN1 F132B_RATÓN
  :**** ,***** ***** * :;***** .*****;****;
301  IMGLESSSELTISVNGVLYLQMGQWTSVFLDNASGCSLTVRSGSHFSVLLGV 354 Q4G0M1 F132B_HUMANO
287  VMGLENSSELTISVNGVLYLQAGHYTSVFLDNASGSSLTVRSGSHFSAILLGL 340 Q6PGN1 F132B_RATÓN
  :**** ,***** ***** * :;***** .*****;****;

```

Figura 3A

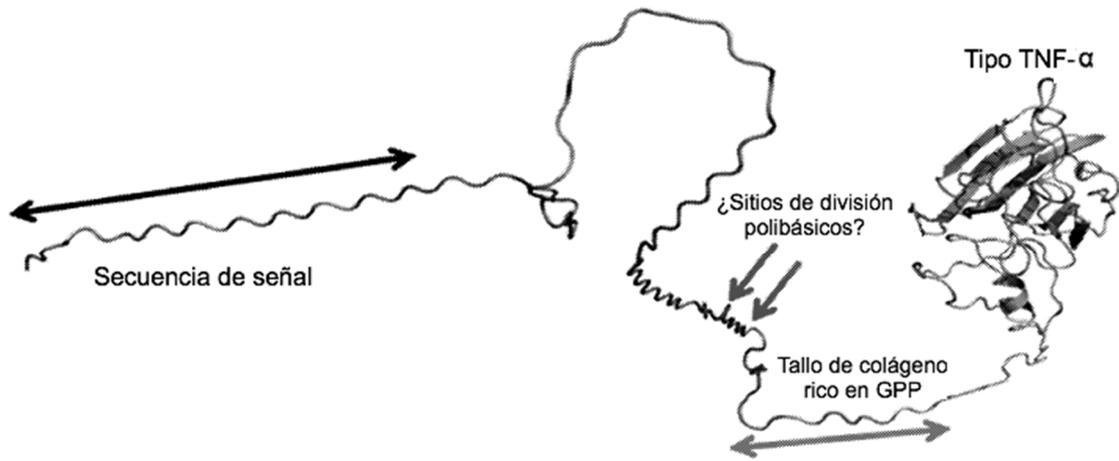


Figura 3B

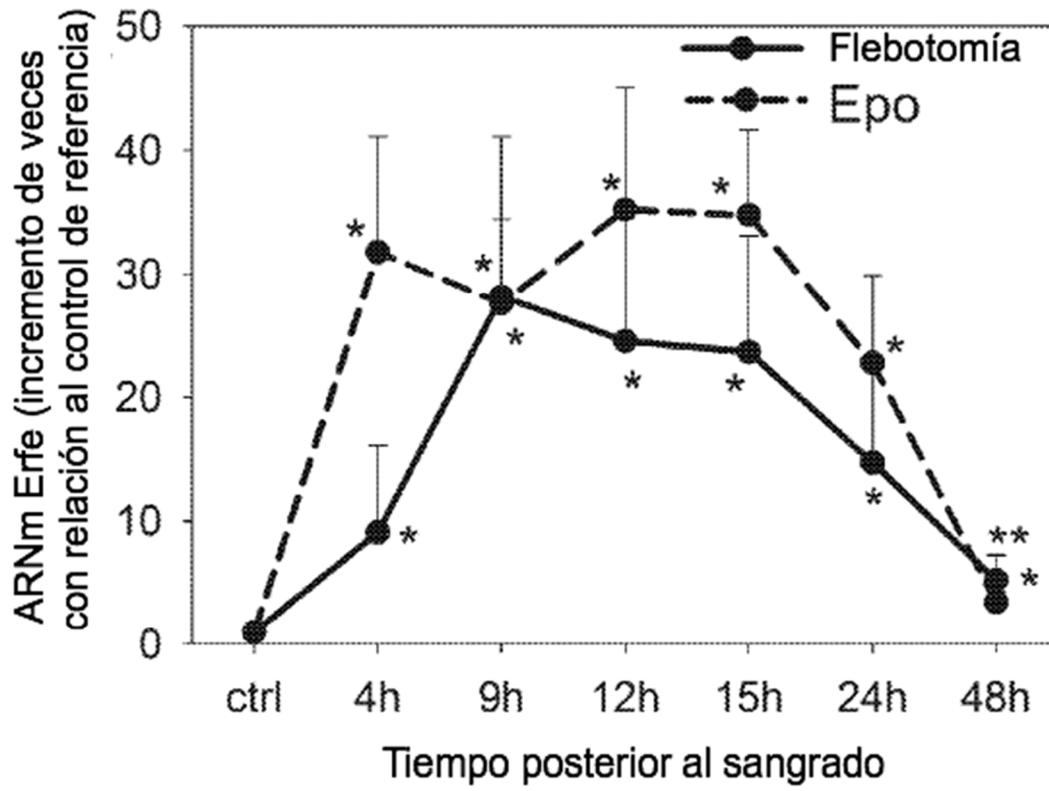


Figura 4

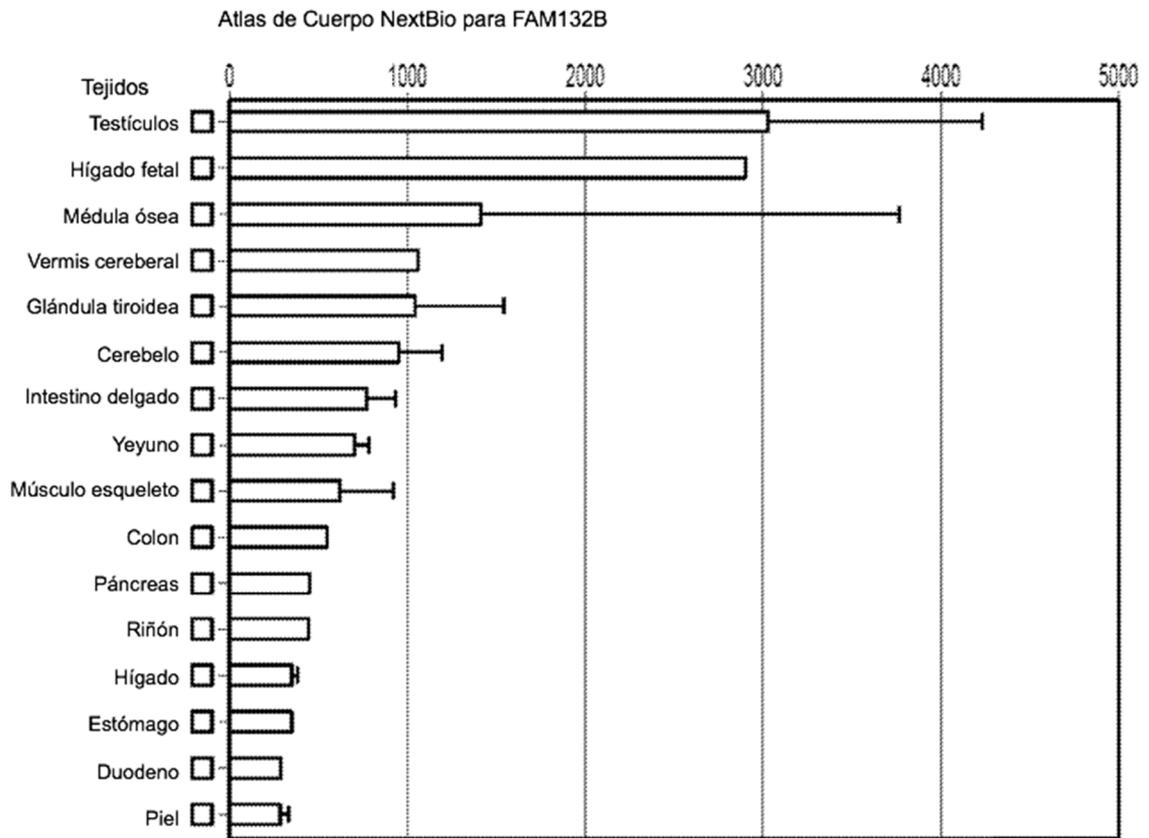


Figura 5A

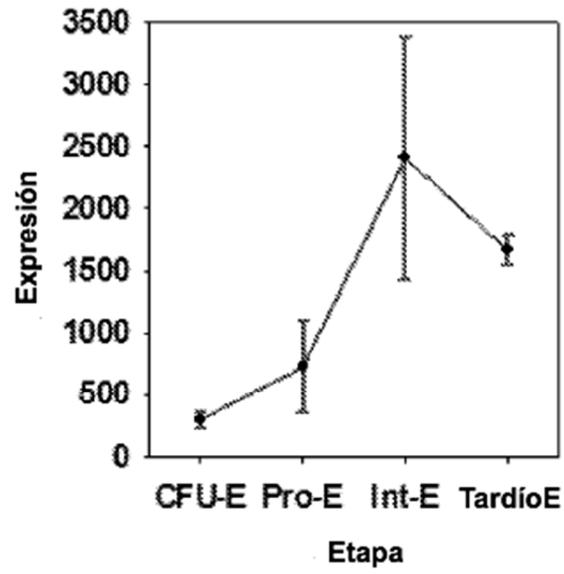


Figura 5B

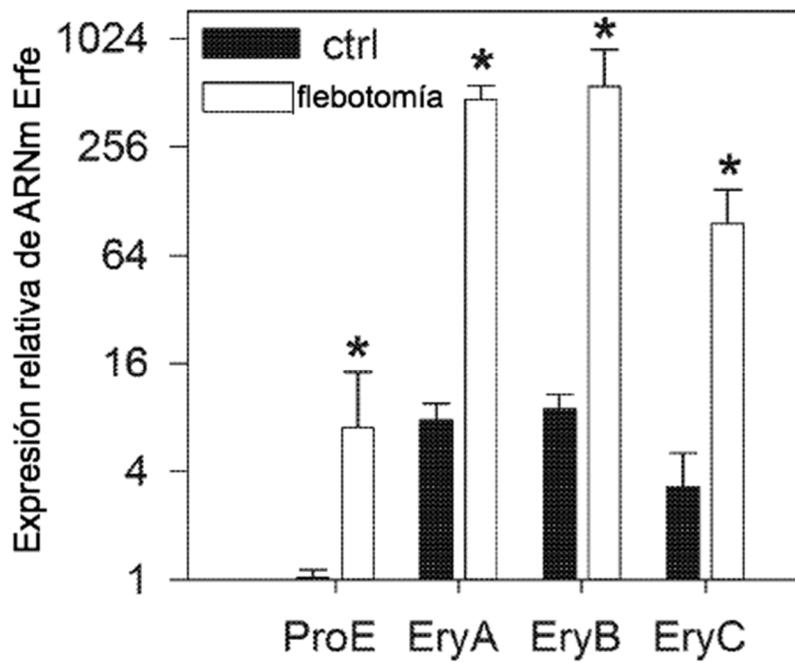


Figura 6

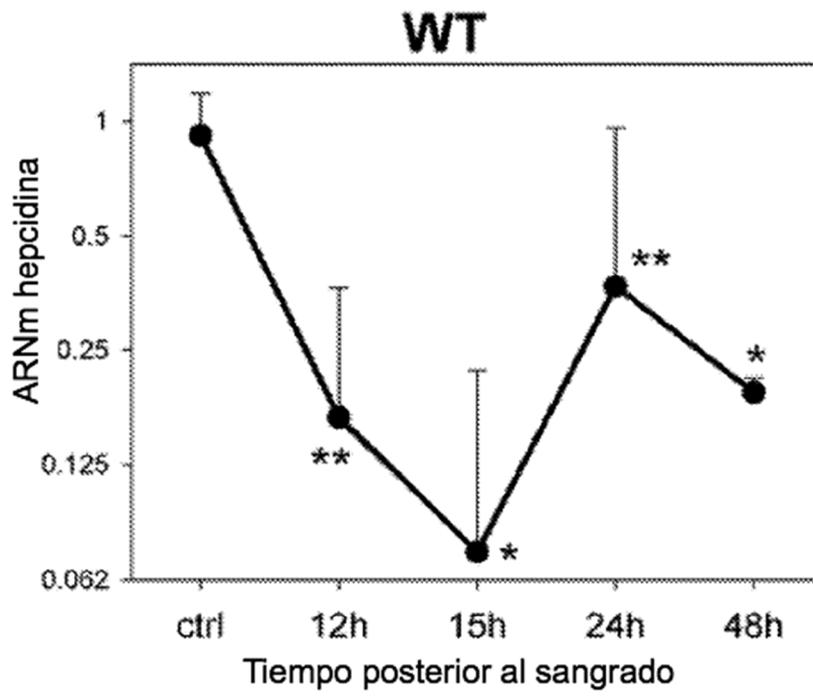


Figura 7A

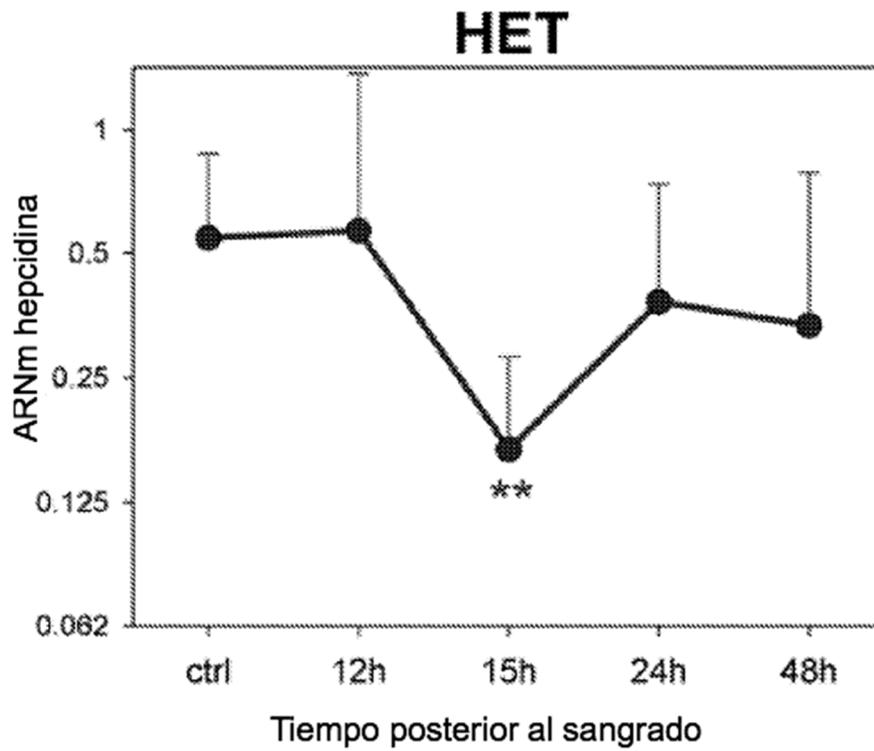


Figura 7B

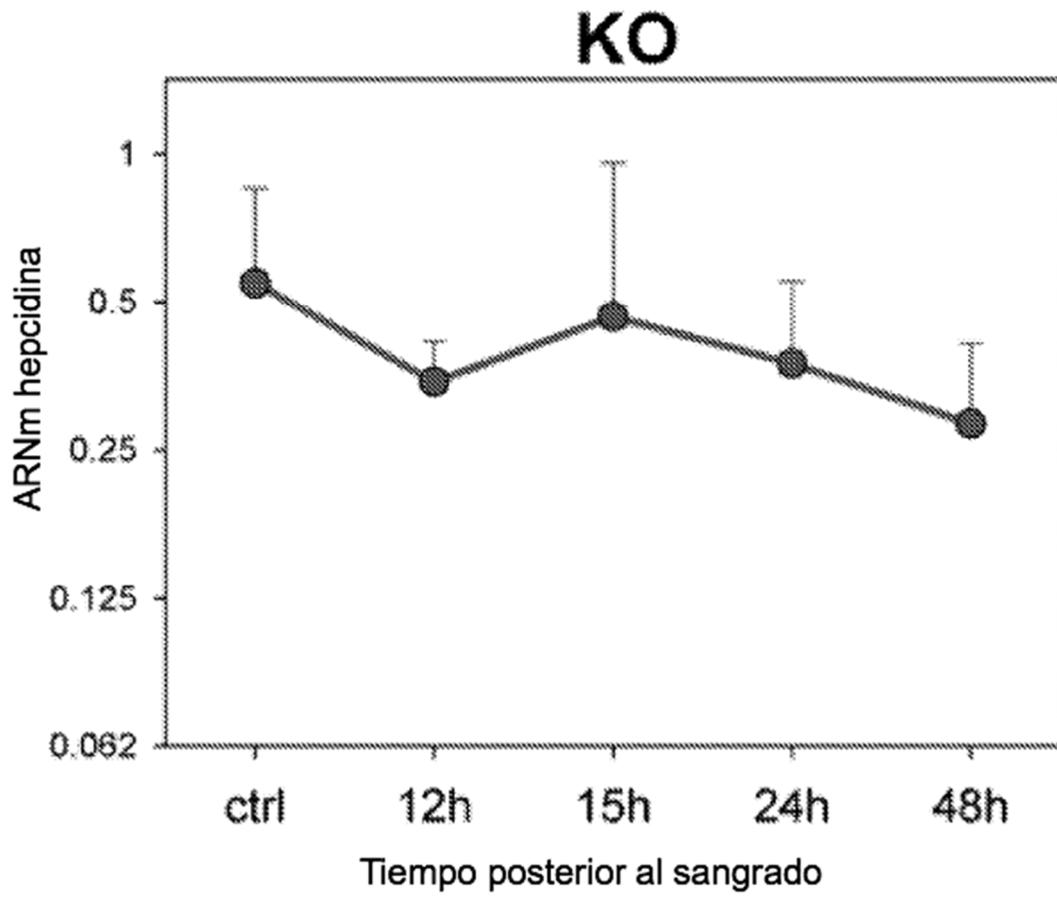


Figura 7C

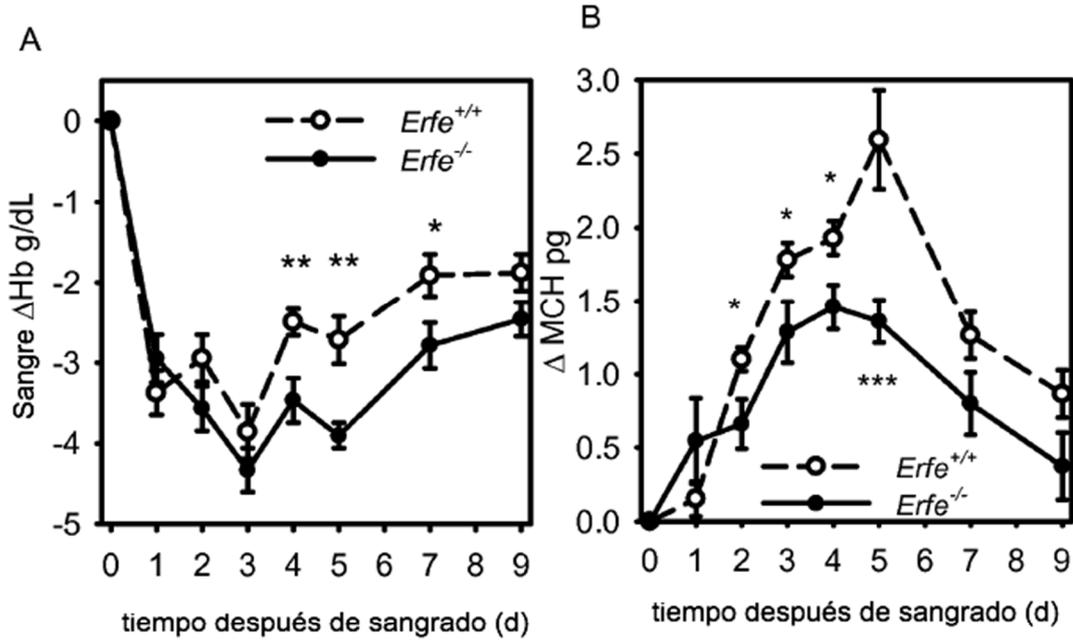


Figura 8

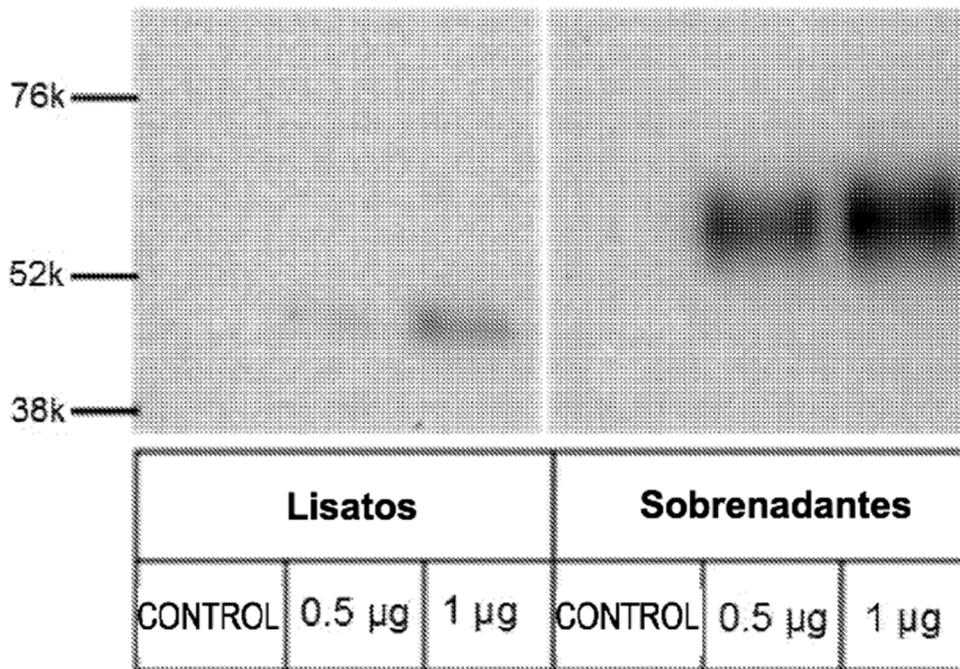
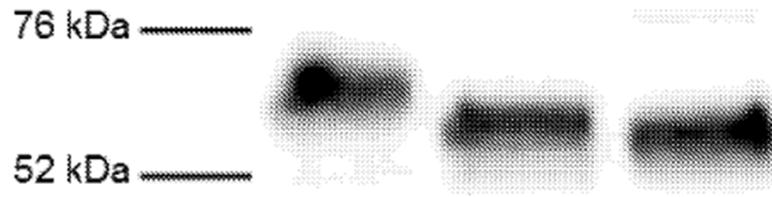


Figura 9A



Eliminación de glicosilación ligada a N	-	+	+
Eliminación de glicosilación ligada a O y N	-	-	+

Figura 9B

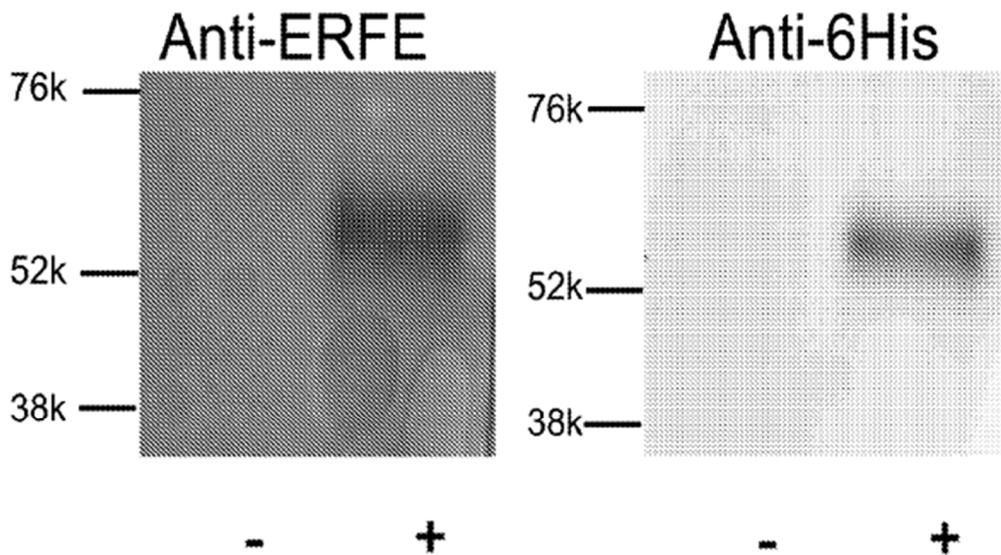


Figura 9C

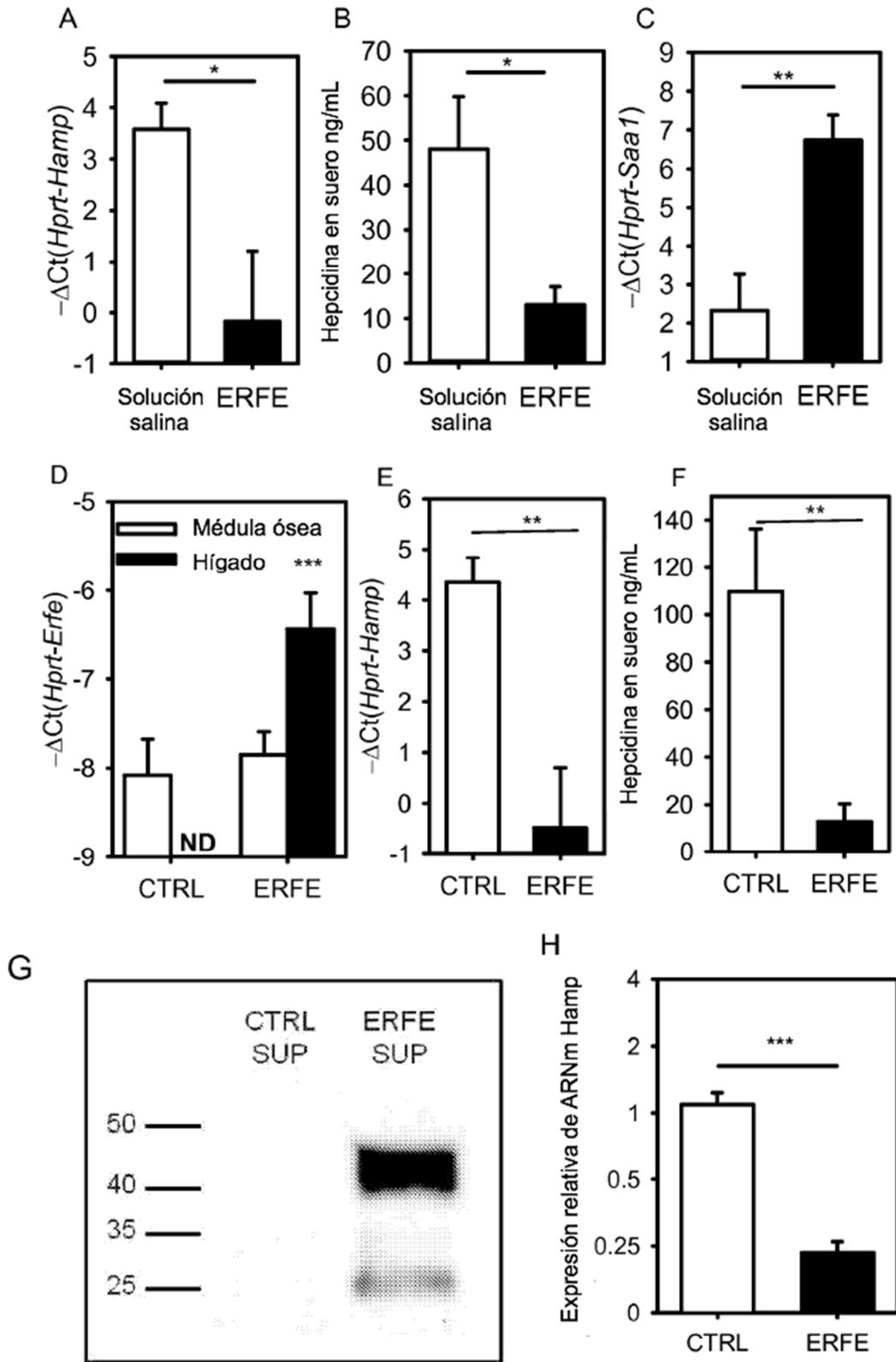


Figura 10

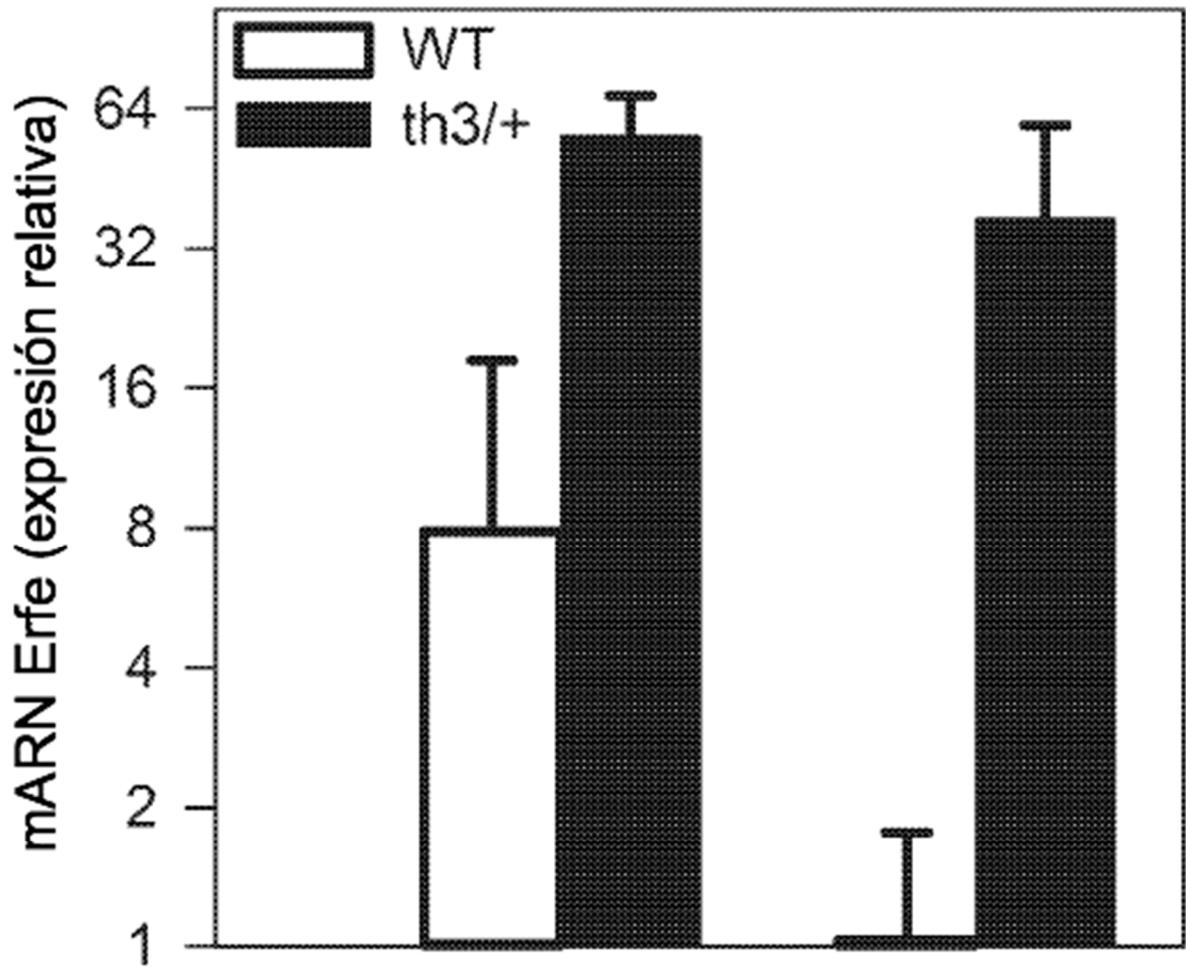


Figura 11

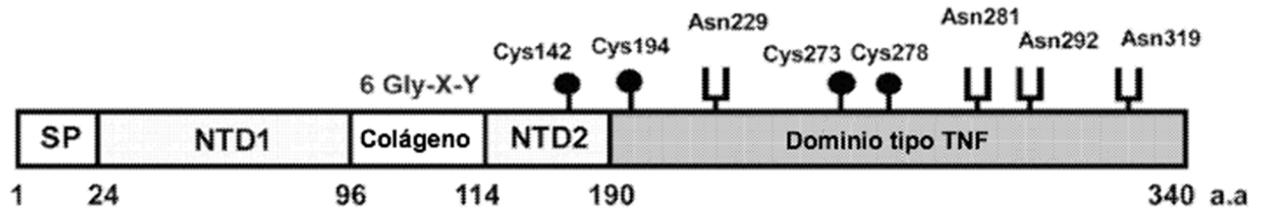


Figura 12