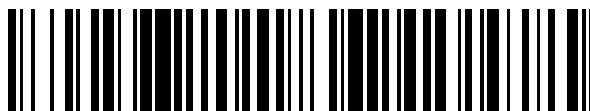


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 663**

51 Int. Cl.:

C12N 9/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2006** **E 06838844 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014** **EP 1977004**

54 Título: **Composiciones de tirosil-ARNt sintetasa angiogénicas y procedimientos**

30 Prioridad:

02.12.2005 US 741580 P

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

11.02.2015

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
10550 NORTH TORREY PINES ROAD
LA JOLLA, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

YANG, XIANG-LEI

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 528 663 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

Composiciones de tirosil-ARNt sintetasa angiogénicas y procedimientos.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones de tirosil-ARNt sintetasa (TyrRS) angiogénicas. Más particularmente, esta invención se refiere a variantes de la proteína TyrRS angiogénicas y fragmentos angiogénicos de las mismas, y a su uso para la estimulación de la angiogénesis.

10 Antecedentes de la invención

Las aminoacil-ARNt sintetatas son enzimas esenciales que catalizan la adición de aminoácidos a sus ARNt afines, como primera etapa en la síntesis de proteína. Estas enzimas esenciales están separadas en dos clases en base a la presencia de motivos de secuencia únicos y a la estructura global de sus dominios catalíticos. Las sintetatas de Clase I tienen dos motivos de aminoácidos muy conservados en los dominios catalíticos de sus diez miembros, por ejemplo, las secuencias HIGH (SEC ID nº: 1) y KMSKS (SEC ID nº: 2). En contraste, las sintetatas de Clase II tienen tres motivos de secuencia muy degenerados, denominados motivos 1-3. Durante los últimos veinte años, varios roles adicionales para las ARNt sintetatas han sido descubiertos, incluyendo el splicing de ARN, la exportación nuclear y la regulación de la transcripción génica. Estas funciones adicionales han sido adquiridas durante la larga evolución de estas enzimas antiguas. Muchas de estas funciones adicionales son el resultado de dominios adjuntos que se han fusionado a las secuencias de sintetasa principales. En los eucariotas superiores, se ha demostrado que los dominios adjuntos de dos sintetatas tienen roles biológicos funcionales no relacionados con la función de la enzima principal. Por ejemplo, se ha demostrado que fragmentos de dos ARNt sintetatas humanas, por ejemplo, la tirosil-ARNt sintetasa (TyrRS) y la triptofanil-ARNt sintetasa (TrpRS), tienen actividades de tipo citoquina. Dos fragmentos relacionados de la TrpRS humana, conocidos como mini-TrpRS y T2-TrpRS, son reguladores negativos de la angiogénesis. La TyrRS humana (SEC ID nº: 3) puede separarse fácilmente en dos fragmentos activos. Un fragmento de dominio adjunto C-terminal tiene una actividad similar a la citoquina proinflamatoria polipéptido II activador del monocito endotelial (EMAP II), mientras que un fragmento N-terminal (mini-TyrRS, residuos 1-364 de SEC ID nº: 3) induce la angiogénesis.

La angiogénesis es un proceso estrechamente regulado en el que debe mantenerse un meticuloso balance entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos. La perturbación de este balance, que conlleva un excesivo o insuficiente crecimiento de vasos sanguíneos, está asociada con enfermedades como la degeneración macular relacionada con la edad, la artritis reumatoide, curación retardada de heridas, así como muchas otras condiciones. La regulación está controlada a través de una variedad de procesos que incluyen un control transcripcional y traduccional, modificaciones postraduccionales y procesamiento de ligando. Otras citoquinas proangiogénicas, incluyendo el factor alfa de necrosis tumoral y el factor de crecimiento de hepatocitos, se generan por división de proteínas precursoras. De forma similar, la división mediante proteasas libera fragmentos de citoquinas a partir de la TrpRS y la TyrRS humanas.

Las enzimas TrpRS y TyrRS de los eucariotas superiores están compuestas por una región central catalítica que incluye un plegamiento de Rossmann que tiene varias hélices alfa intercaladas en segmentos de hoja beta. El dominio catalítico de plegamiento de Rossmann de la TyrRS humana (residuos 1 a 230 de SEC ID nº: 3) incluye una fijación por puente de hidrógeno de la hélice $\alpha 5$ del dominio de plegamiento de Rossmann y la hélice $\alpha 14$ del dominio de reconocimiento de anticodón (ver Fig. 3, Panel Inferior, y Fig. 4 Panel Superior). La fijación bloquea parcialmente el motivo Glu-Leu-Arg (ELR) en la hélice $\alpha 5$ del dominio de sitio activo de la proteína.

Los dominios catalíticos de la TyrRS y la TrpRS humanas son cada uno homólogos a los dominios catalíticos de sus respectivas enzimas bacterianas y de eucariotas inferiores correspondientes, adjuntos a una extensión C-terminal o N-terminal, respectivamente. La extensión C-terminal de la TyrRS humana comparte aproximadamente 51% de identidad de secuencia con la citoquina proinflamatoria EMAP II. En cada caso, las enzimas de longitud completa son inactivas como citoquinas pero funcionales como sintetatas. Cuando las extensiones únicas de eucariotas superiores se eliminan, las enzimas se vuelven citoquinas activas capaces de controlar la angiogénesis.

Actualmente, se ha descubierto que abriendo la separación entre la hélice $\alpha 5$ del dominio catalítico de plegamiento de Rossmann y la hélice $\alpha 14$ del dominio de reconocimiento de anticodón con respecto a la separación de estas hélices en la TyrRS humana nativa, se transforma la proteína en angiogénica. La presente invención se refiere a variantes de la proteína TyrRS y fragmentos de las mismas, que son útiles para estimular la angiogénesis en tejidos de mamífero.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a variantes polipeptídicas de TyrRS biológicamente activas y fragmentos angiogénicos de las mismas (colectivamente denominados en la presente memoria "variantes polipeptídicas de TyrRS") que son adecuados para estimular la angiogénesis en tejidos de mamífero. Las variantes polipeptídicas de

tirosil-ARNt sintetasa (TyrRS) aisladas de la invención comprenden una región de plegamiento de Rossmann o una porción de la misma; un dominio de reconocimiento de anticodón o una porción del mismo; e incluyen por lo menos una sustitución no conservativa de un residuo de aminoácido en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 46, 340 y 341 de la TyrRS humana (SEC ID n°: 3). Las variantes presentan una actividad que es mayor que la actividad angiogénica de la TyrRS humana nativa. Las variantes polipeptídicas de TyrRS de la invención tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 50% comparado con la secuencia de residuos de aminoácidos de la TyrRS humana (SEC ID n°: 3), más preferentemente de por lo menos 80% de identidad de secuencia y aún más preferentemente de por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia comparado con SEC ID n°: 3.

La región de plegamiento de Rossmann o una porción de la misma incluye una hélice $\alpha 5$, y el dominio de reconocimiento de anticodón o una porción del mismo incluye una hélice $\alpha 14$.

En una forma de realización, dicha por lo menos una sustitución no conservativa de un residuo de aminoácido con respecto a la secuencia de residuos de aminoácido de la TyrRS humana abre la separación entre la hélice $\alpha 5$ y la hélice $\alpha 14$, con respecto a la separación de la hélice $\alpha 5$ y la hélice $\alpha 14$ en la TyrRS humana nativa. Preferentemente, la hélice $\alpha 14$ se separa de por lo menos 6 angstroms de la hélice $\alpha 5$ en la estructura terciaria de la variante, según lo determinado por la separación espacial entre el carbono alfa de cualquier residuo de aminoácido de la hélice $\alpha 14$ y el carbono alfa de cualquier residuo de aminoácido de la hélice $\alpha 5$. Preferentemente, la variante está libre de puentes de hidrógeno entre la hélice $\alpha 5$ y la hélice $\alpha 14$.

En otra forma de realización específica de la variante polipeptídica de TyrRS de la invención, la hélice $\alpha 5$ incluye un motivo ELR, y la hélice $\alpha 14$ está espaciada por lo menos 6 Ångström del motivo ELR de la hélice $\alpha 5$ en la estructura terciaria de la variante, según lo determinado por la separación espacial entre el carbono alfa de cualquier residuo de aminoácido de la hélice $\alpha 14$ y el carbono alfa de cualquier residuo de aminoácido de la hélice $\alpha 5$. La variante presenta un motivo ELR expuesto en una porción externa de la estructura terciaria del polipéptido.

En una forma de realización, dicha por lo menos una sustitución no conservativa de un residuo de aminoácido con respecto a la secuencia de residuos de aminoácido de la TyrRS humana evita la formación de una fijación por puentes de hidrógeno entre el motivo ELR de la hélice $\alpha 5$ y los residuos de aminoácido de la hélice $\alpha 14$ de la variante polipeptídica de TyrRS que resulta en la exposición del motivo ELR en la estructura terciaria de la variante.

Una sustitución particularmente preferida es el reemplazo del aminoácido correspondiente a la tirosina en posición 341 de SEC ID n°: 3 por un residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral alifática, preferentemente una cadena lateral alifática no polar, como un residuo de alanina.

Las variantes polipeptídicas de TyrRS de la invención son adecuadas para estimular la angiogénesis en tejidos de mamífero (por ejemplo, humano).

La presente invención también se refiere a las variantes polipeptídicas de TyrRS de la invención para su uso en la estimulación de la angiogénesis y de la migración de células endoteliales en un tejido de un mamífero poniendo en contacto el tejido con una variante polipeptídica de TyrRS de la invención.

Breve descripción de los Dibujos

La Fig. 1 muestra la secuencia de residuos de aminoácido de la TyrRS humana (SEC ID n°: 3).

La Fig. 2 muestra la secuencia de residuos de aminoácido de una variante de TyrRS humana de la invención preferida (SEC ID n°: 4).

La Fig. 3 muestra un diagrama esquemático de la secuencia de la TyrRS humana de tipo salvaje, que está compuesta por 3 dominios: el dominio catalítico de plegamiento de Rossmann (residuos 1-230), el dominio de reconocimiento de anticodón (residuos 231-364) y el dominio C-terminal (residuos 364-528). Los dos primeros dominios forman la enzima principal activa, que se denomina mini TyrRS (residuos 1-364). El Panel Inferior muestra un modelo dimérico de la TyrRS humana basado en estructuras cristalina de ambos, de mini TyrRS y del dominio C-terminal, que fueron determinadas experimentalmente.

La Fig. 4 (Panel Superior) muestra detalles de la interacción de la región ELR con otros residuos, incluyendo Y341. El Panel Inferior muestra el alineamiento de secuencia parcial de la TyrRS de un rango de organismos en el cual los residuos correspondientes a las tres regiones de la TyrRS humana están alineados, por ejemplo, residuos 39-55 (Región 1), residuos 87-97 (Región 2) y residuos 337-346 (Región 3). Los residuos conservados, implicados en los contactos entre dominios, están resaltados. La Fila 1 incluye residuos de aminoácido de la TyrRS humana en la que la Región 1 corresponde con SEC ID n°: 5, la Región 2 corresponde con SEC ID n°: 6 y la Región 3 corresponde con SEC ID n°: 7. La Fila 2 muestra el alineamiento de la TyrRS murina, en la que la Región 1 corresponde con SEC ID n°: 5, la Región 2 corresponde con SEC ID n°: 6 y la Región 3 corresponde con SEC ID n°: 7, como en la TyrRS humana. La Fila 3 muestra el alineamiento de la TyrRS bovina en la que la Región 1 corresponde con SEC ID n°: 5,

la Región 2 corresponde con SEC ID nº: 8 y la Región 3 corresponde con SEC ID nº 9. La Fila 4 muestra el alineamiento de la TyrRS de *Drosophila melanogaster* en la que la Región 1 corresponde con SEC ID nº: 5, la Región 2 corresponde con SEC ID nº: 10 y la Región 3 corresponde con SEC ID nº 11. La Fila 5 muestra el alineamiento de la TyrRS de *Caenorhabditis elegans* en la que la Región 1 corresponde con SEC ID nº: 12, la Región 2 corresponde con SEC ID nº: 13 y la Región 3 corresponde con SEC ID nº 14. La Fila 6 muestra el alineamiento de la TyrRS de *Saccharomyces cerevisiae* en la que la Región 1 corresponde con SEC ID nº: 15, la Región 2 corresponde con SEC ID nº: 16 y la Región 3 corresponde con SEC ID nº 17. La Fila 7 muestra el alineamiento de la TyrRS de *Saccharomyces pombe* en la que la Región 1 corresponde con SEC ID nº: 18, la Región 2 corresponde con SEC ID nº: 19 y la Región 3 corresponde con SEC ID nº 20. La Fila 8 muestra el alineamiento de la TyrRS de *Escherichia coli* en la que la Región 1 corresponde con SEC ID nº: 21, la Región 2 corresponde con SEC ID nº: 22 y la Región 3 corresponde con SEC ID nº 23. La Fila 9 muestra el alineamiento de la TyrRS de *Bacillus subtilis* en la que la Región 1 corresponde con SEC ID nº: 24, la Región 2 corresponde con SEC ID nº: 25 y la Región 3 corresponde con SEC ID nº 26.

La Fig. 5 muestra una distribución de difracción de rayos X para la TyrRS humana y la TyrRS-Y341A. Las funciones de distribución de distancias entre pares de electrones se calcularon para la TyrRS humana y para la mutación Y341A de la TyrRS utilizando sus gráficas de difracción de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) medidas. El Radio de Giro (R_g) y la Distancia máxima (D_{max}) se calcularon para ambas moléculas. Y341A tiene un R_g que es aproximadamente 4 angstroms mayor, y una D_{max} que es aproximadamente 20 angstroms mayor que los de la TyrRS de tipo salvaje.

La Fig. 6 ilustra esquemáticamente el efecto de apertura de la mutación Y341A en la estructura terciaria global de la TyrRS humana que expone el motivo ELR. Se demostró, mediante análisis SAXS y estudios de digestión por proteasas, que la mutación Y341A abre la estructura de la TyrRS tal como se muestra.

La Fig. 7 ilustra la actividad de la TyrRS-Y341A en el modelo de angiogénesis en Matrigel en ratón. Los ratones recibieron una inyección subcutánea de 400 μ L de Matrigel reducido en factor de crecimiento solo o mezclado con 250 nM de proteínas TyrRS. Se utilizó VEGF₁₆₅ (20 nM) humano como control positivo. Después de una incubación de 5 días, se inyectó lectina de unión a endotelio *Griffonia* (Bandeiraea) *Simplicifolia* I marcada con fluoresceína, isolectina B4 por vía intravenosa a los ratones. Los implantes fueron extirpados, disueltos y se evaluó su contenido en fluoresceína mediante espectrometría. Se observó que la variante TyrRS Y341A abierta tiene una actividad de angiogénica aumentada con respecto a la TyrRS de tipo salvaje.

La Fig. 8 ilustra la actividad de la TyrRS humana y de la TyrRS-Y341A en el ensayo en membrana corioalantoidea de pollo. La actividad angiogénica de las proteínas TyrRS se probó *in vivo* mediante el ensayo en membrana corioalantoidea de pollo. Las variantes de TyrRS (1 μ M), un control positivo consistiendo en una combinación de VEGF y bFGF, así como un control negativo consistiendo de tampón solo, se aplicaron sobre la CAM en un implante de colágeno con una malla de nylon embebida.

La Fig. 9 muestra un gráfico del porcentaje de área (eje vertical) entre el área libre de células restante comparado con el área de la herida inicial en cultivos de células endoteliales heridos tratados con variantes de TyrRS de la invención y tratamientos control.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

Los residuos de aminoácido en proteínas se han clasificado de una gran variedad de formas, principalmente en base a las características físico-químicas impartidas por las cadenas laterales de los aminoácidos. Por ejemplo, una clasificación corriente incluye tres categorías de aminoácidos: (1) aminoácidos hidrofóbicos (no polares), incluyendo glicina, alanina, valina, fenilalanina, prolina, metionina, isoleucina y leucina; (2) aminoácidos cargados, incluyendo ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y arginina; y (3) aminoácidos polares, incluyendo serina, treonina, tirosina, histidina, cisteína, asparagina, glutamina y triptófano; la glicina se incluye a veces en su propia, cuarta categoría (ver Capítulo 1 de Branden y Tooze, *Introduction to Protein Structure*, Segunda Edición, Garland Publishing, Inc. 1998, páginas 3-12).

Los residuos de aminoácido pueden asimismo ser clasificados en base a si sus cadenas laterales son alifáticas o aromáticas, pequeñas o voluminosas, polares o no polares, cargadas o no cargadas, combinaciones de las mismas y similares. Tal como se utiliza en la presente memoria, los aminoácidos no polares alifáticos incluyen glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina y prolina; los aminoácidos voluminosos no cargados incluyen tirosina, triptófano, fenilalanina, leucina, isoleucina y metionina; los aminoácidos pequeños no polares incluyen glicina, alanina y prolina.

Tal como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, el término "no conservativa", cuando se utiliza en relación con sustituciones de un residuo de aminoácido, significa la sustitución de un residuo de aminoácido en una proteína de tipo salvaje o natural por un residuo de aminoácido de una categoría estructural diferente, por ejemplo, que tenga una clasificación de polaridad significativamente diferente (por ejemplo, no polar versus polar), una clasificación de tamaño diferente, una clasificación de carga diferente, una combinación de las

anteriores, y similares. Por ejemplo, para una sustitución no conservativa, un aminoácido polar como la tirosina puede ser remplazado por un aminoácido no polar, un aminoácido relativamente pequeño no polar, y similares; mientras que un aminoácido pequeño no polar, como la glicina o la alanina, puede ser remplazado por un aminoácido voluminoso, un aminoácido cargado, y similares.

Una variante polipeptídica de TyrRS aislada preferida, como forma de realización de la presente invención, es adecuada para estimular la angiogénesis en tejidos de mamífero. La variante tiene una separación entre la hélice $\alpha 5$ y la hélice $\alpha 14$ en la variante, que es mayor que la separación entre la hélice $\alpha 5$ y la hélice $\alpha 14$ en la TyrRS humana nativa. Preferentemente, la hélice $\alpha 14$ está separada de la hélice $\alpha 5$ por al menos 6 angstroms en la estructura terciaria de la variante, según lo determinado por la separación espacial entre el carbono alfa de cualquier residuo de aminoácido de la hélice $\alpha 14$ y el carbono alfa de cualquier residuo de aminoácido de la hélice $\alpha 5$. La variante polipeptídica está preferentemente libre de puentes de hidrógeno entre la hélice $\alpha 5$ y la hélice $\alpha 14$. La variante polipeptídica de TyrRS tiene una identidad de secuencia de residuos de aminoácido de por lo menos 50% en comparación con la secuencia de residuos de aminoácido de la TyrRS humana nativa (SEC ID n°: 3, Fig. 1), más preferentemente una identidad de secuencia de por lo menos 80%, aún más preferentemente una identidad de secuencia de por lo menos 95%. La variante incluye por lo menos una sustitución no conservativa de un residuo de aminoácido con respecto a la secuencia de residuos de aminoácido de la TyrRS humana, que abre la separación entre la hélice $\alpha 5$ y la hélice $\alpha 14$, en comparación con la separación de la hélice $\alpha 5$ y la hélice $\alpha 14$ en la TyrRS humana nativa, y confiere una actividad angiogénica a la variante.

En otra forma de realización preferida de la invención, la variante de TyrRS de la invención comprende una región de plegamiento de Rossmann o una porción de la misma que presenta un motivo ELR expuesto en una porción externa de la estructura terciaria del polipéptido, y que tiene una identidad de secuencia de residuos de aminoácido de por lo menos 50% con respecto a la secuencia de residuos de aminoácido de la TyrRS humana (SEC ID n°: 3), preferentemente una identidad de secuencia de por lo menos 80%, más preferentemente una identidad de secuencia de aproximadamente 95%. La variante polipeptídica de TyrRS incluye por lo menos una sustitución no conservativa de un residuo de aminoácido, con respecto a la secuencia de residuos de aminoácido de la TyrRS humana, que expone el motivo ELR de la hélice $\alpha 5$ del dominio catalítico de plegamiento de Rossmann, haciendo que el polipéptido sea angiogénico. En las variantes de la invención, los residuos ELR de la hélice $\alpha 5$ están preferentemente espaciados de por lo menos aproximadamente 6 angstroms de los residuos de la hélice $\alpha 14$ en la estructura terciaria de la variante, según lo determinado por la separación espacial entre el carbono alfa de cualquier residuo de aminoácido de la hélice $\alpha 14$ y el carbono alfa de cualquier residuo de aminoácido del motivo ELR de la hélice $\alpha 5$.

Dicha por lo menos una sustitución no conservativa de un residuo de aminoácido es una sustitución de un residuo de aminoácido por lo menos en una o más posiciones correspondientes a los residuos de aminoácido 46, 340 y 341 de SEC ID n°: 3. Por ejemplo, la tirosina en la posición 341 de SEC ID n°: 3 está reemplazada preferentemente por un residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral no polar (por ejemplo, un aminoácido alifático no polar, como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina y prolina). El residuo de aminoácido correspondiente a la glicina en la posición 46 y/o la alanina en la posición 340 de SEC ID n°: 3 está reemplazado preferentemente por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral voluminosa no polar (por ejemplo, un aminoácido voluminoso, no cargado hidrofóbico como tirosina, triptófano, fenilalanina, leucina, isoleucina o metionina). Tal como se utiliza en la presente memoria, una referencia a un aminoácido en una variante polipeptídica de TyrRS "correspondiente a" un residuo de aminoácido en una secuencia especificada, tal como SEC ID n°: 3, significa el aminoácido en una posición en la secuencia homóloga de la variante polipeptídica de TyrRS, que se alinea con (por ejemplo, corresponde a) la posición especificada en SEC ID n°: 3, cuando la secuencia homóloga se compara con la secuencia especificada. El experto en la materia en el campo de las proteínas entenderá que la numeración del residuo de aminoácido en la secuencia homóloga puede ser diferente de la numeración en la secuencia especificada (por ejemplo, SEC ID n°: 3).

En otra forma de realización, una variante polipeptídica de TyrRS aislada de la presente invención comprende una región de plegamiento de Rossmann o una porción de la misma que presenta un motivo ELR expuesto en una porción externa de la proteína o fragmento, y que tiene una identidad de secuencia de residuos de aminoácido de por lo menos 50% en comparación con la secuencia de residuos de aminoácidos de la TyrRS humana (SEC ID n°: 3). Preferentemente, la secuencia de residuos de aminoácido de la variante tiene una identidad de secuencia de por lo menos 80%, más preferentemente una identidad de secuencia de aproximadamente 95%, e incluye por lo menos un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral no polar en la posición correspondiente a la posición 341 de SEC ID n°: 3. Preferentemente, el residuo de aminoácido tiene una cadena lateral no polar alifática. Por ejemplo, el residuo de aminoácido de la variante correspondiente al residuo de tirosina 341 en la TyrRS humana puede ser un residuo de glicina, un residuo de alanina, un residuo de fenilalanina, un residuo de valina, un residuo de leucina, un residuo de isoleucina, un residuo de metionina o un residuo de prolina. En alguna forma de realización, el residuo de aminoácido correspondiente a la tirosina 341 de la TyrRS humana es un residuo de glicina, un residuo de alanina o un residuo de prolina, preferentemente un residuo de alanina.

En otra forma de realización preferida, la variante polipeptídica de TyrRS aislada comprende la secuencia de residuos de aminoácidos de SEC ID n°: 4 (Fig. 2) o un fragmento de la misma, en la que el residuo X en la posición

341 de SEC ID nº: 4 es un residuo de glicina, un residuo de alanina, un residuo de fenilalanina, un residuo de valina, un residuo de leucina, un residuo de isoleucina, un residuo de metionina o un residuo de prolina, preferentemente un residuo de glicina, un residuo de alanina o un residuo de prolina, más preferentemente un residuo de alanina. Preferentemente, la variante polipeptídica de TyrRS comprende la región N-terminal entera (por ejemplo, residuos 1-341) de SEC ID nº: 4. Preferentemente, un fragmento incluye por lo menos los residuos de la cadena $\alpha 5$ de la región de plegamiento de Rossmann, por ejemplo, los residuos correspondientes a las posiciones 87 a 104 de SEC ID nº: 4. Más preferentemente, el fragmento comprende la región de plegamiento de Rossmann entera (residuos 1-230 de SEC ID nº: 4).

Una variante polipeptídica de TyrRS angiogénica de la invención particularmente preferida consiste en la secuencia de residuos de aminoácido de SEC ID nº: 4, en la que el residuo X en la posición 341 de SEC ID nº: 4 se selecciona de entre el grupo formado por un residuo de glicina, un residuo de alanina, un residuo de fenilalanina, un residuo de valina, un residuo de leucina, un residuo de isoleucina, un residuo de metionina y un residuo de prolina. Más preferentemente, el residuo X en posición 341 de SEC ID nº: 4 se selecciona de entre el grupo formado por un residuo de glicina, un residuo de alanina y un residuo de prolina, aún más preferentemente es un residuo de alanina.

La presente invención también se refiere a una variante polipeptídica de TyrRS de la invención para su uso en la estimulación de la angiogénesis en el tejido de un mamífero. El procedimiento comprende poner en contacto el tejido con una cantidad angiogénica de una variante polipeptídica de TyrRS de la invención tal como se describe en detalle en la presente memoria.

Además, la presente invención se refiere a una variante polipeptídica de TyrRS de la invención para su uso en un procedimiento de estimulación de la migración de células endoteliales en el tejido de un mamífero. El procedimiento comprende poner en contacto el tejido con una cantidad de una variante polipeptídica de TyrRS de la invención estimuladora de la migración de células endoteliales tal como se describe en detalle en la presente memoria.

Métodos y procedimientos

Construcción de plásmidos. Los plásmidos de TyrRS-Y341A y mini-TyrRS-Y341A se construyeron utilizando el kit de mutagénesis dirigida QuickChange (Stratagene, La Jolla, CA). Los moldes fueron vectores pET20b(+) (Novagen, Madison, WI) conteniendo la TyrRS de tipo salvaje y la mini TyrRS respectivamente.

Todas las proteínas se expresaron con una cola de histidinas (His-Tag) C-terminal para facilitar el aislamiento del polipéptido. Los oligonucleótidos sintéticos se adquirieron de Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA).

Producción de proteína y eliminación de endotoxinas. Los polipéptidos recombinantes se expresaron en células de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, CA). Las células se crecieron hasta una OD₆₀₀ de 0,8 y se indujeron durante 3 horas con 1 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (Roche, Basilea, Suiza). Las células fueron entonces peletizadas y resuspendidas en Tampón A (20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 30 mM imidazol, 500 mM NaCl). Después de una lisis por sonicación, los restos celulares se separaron mediante centrifugación a 74.000 g durante 30 minutos. Los polipéptidos marcados con His-Tag se purificaron mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA. El sobrenadante se cargó en una columna de afinidad Ni-NTA (Qiagen, Valencia, CA), se lavó con 100 mL de Tampón B (Tampón A con 0,1% de Triton-X114 (Sigma, St. Louis, MO)) y 150 mL de Tampón A. Los polipéptidos se eluyeron con un gradiente lineal de Tampón A y Tampón C (20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 250 mM imidazol, 500 mM NaCl). Se juntaron las fracciones conteniendo polipéptidos con una pureza >95%, se concentraron y se dializaron en tampón de almacenamiento (50% tampón salino fosfato, PBS, pH 7,4, 50% glicerol, 2 mM ditiotretitol, DTT). La concentración de proteínas se determinó mediante un ensayo de Bradford utilizando el reactivo de ensayo de Proteína de Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA) con albúmina de suero bovino (BSA, Sigma, St. Louis, MO) como estándar. La concentración de endotoxina se determinó utilizando el ensayo de lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL) (BioWhittaker, Walkersville, MD).

Difracción de rayos X de ángulo pequeño. Mediciones de difracción de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) se realizaron para la TyrRS de tipo salvaje y la variante TyrRS-Y341A de la invención en la línea de luz 4-2 en el Laboratorio de Radiación Sincrotrón de Stanford (SSRL). Las curvas de difracción de rayos X se midieron para muestras a varias concentraciones (2-20 g/L). La longitud de onda de los rayos X (λ) fue de 1,38 Å y los números de canal del detector fueron convertidos a la transferencia de momentum $Q=4\pi\sin\theta/\lambda$, en donde 2θ es el ángulo de difracción. Se utilizaron dos distancias de muestra a detector diferentes para cubrir desde ángulos de difracción muy pequeños hasta ángulos de difracción medianos, por ejemplo, 2,5 metros cubriendo un rango de Q de aproximadamente 0,01-0,25 Å⁻¹ y 0,5 metros para cubrir un rango de Q de aproximadamente 0,03-0,93 Å⁻¹.

Se llenó una cubeta de policarbonato con ventanas de mica con una alícuota de muestra y se mantuvo a 20°C durante las mediciones. Se utilizó un detector MarCCD165 durante toda la recolección de datos. Un conjunto de datos típico consistió en 24 imágenes de difracción bidimensionales tomadas en series durante 10 segundos cada una. Las series de datos fueron procesadas junto con los correspondientes datos de difracción de los tampones, típicamente adquiridos inmediatamente después o antes de la medición de la solución de proteína. Se ajustó la escala de los datos respecto a la intensidad del haz de luz integrada, se promediaron azimutalmente, se inspeccionaron para cambios dependientes del tiempo y se analizaron estadísticamente. Durante el promediado se

permitieron variaciones estadísticas hasta 1,5 veces mayores en relación con la variación de los datos de los tampones correspondientes. Más allá de este nivel, cualquier conjunto de datos que mostrara un nivel de desviación superior con respecto al primer conjunto de datos de difracción de proteína fue rechazado. Las curvas de difracción de los tampones procesadas se sustrajeron de las correspondientes curvas de difracción de proteína después del procesamiento de los datos arriba mencionado.

El ajuste de escala para los datos de ángulo pequeño y de ángulo grande se realizó con el software PRIMUS (Konarev *et al.* 2003. "PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis", *J. Appl. Crystallogr.* 36:1277-1282), que también fue utilizado para computar R_g e $I(Q=0)$ mediante un diagrama de Guinier en el rango de $Q \cdot R_g$ de 0,45-1,3. La función de distribución de las distancias entre pares de electrones $P(r)$ se obtuvo mediante una transformada indirecta de Fourier de los datos experimentales utilizando el programa de procesamiento de datos de difracción de ángulo pequeño GNOM de Svergun *et al.* (disponible en el sitio Web de embl-hamburg(punto)de), inicialmente sólo con los datos de ángulo pequeño para obtener un estimado preciso de la distancia máxima (D_{max}). Posteriormente, para la construcción del modelo, $P(r)$ se recalculó incluyendo los datos de ángulo grande con los valores de D_{max} especificados arriba.

Digestión por proteasa. La TyrRS de tipo salvaje y la TyrRS-Y341A se mezclaron con plasmina o elastasa de leucocito, con una proporción de proteína con respecto a proteasa de aproximadamente 32 μ g por μ g de plasmina, y 2500 μ g por unidad para la elastasa. Las mezclas se incubaron a 20°C durante aproximadamente 2 horas antes de parar las reacciones mediante la adición de ácido fórmico hasta una concentración final de 0,1%. Los fragmentos de rotura en las mezclas se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI TOF y por secuenciación N-terminal utilizando la degradación de Edman.

Ensayo de angiogénesis CAM. Los ensayos de angiogénesis en membrana corioalantoidea de pollo se realizaron mediante el siguiente procedimiento. Se incubaron huevos fertilizados, negativos para la prueba de fijación de complemento del virus de la leucosis aviar (COFAL) (Charles River Labs, Storrs, CT) durante 3,5 días a 38°C / 60% de humedad. A continuación se abrieron los huevos y se transfirieron los embriones a navecillas de plástico estériles. Los embriones se cubrieron y se incubaron a 37,5°C / 90% de humedad. Después de cinco días, se colocaron implantes de colágeno/malla conteniendo aproximadamente 30 μ L de PBS, VEGF y bFGF (aproximadamente 0,15 y 0,5 μ g, respectivamente) o polipéptidos TyrRS (1 μ M) sobre la membrana CAM de los embriones, y se incubaron durante 66 horas adicionales. Las capas superiores de la malla de los implantes se examinó bajo un microscopio estereó y puntuada en función de la proporción de "cajas" (por ejemplo, regiones tridimensionales definidas por las fibras de la malla) que contienen un vaso sanguíneo con respecto al número total de cajas.

Ensayo de angiogénesis en Matrigel murino. Se implantaron de forma subcutánea, en ratones wehi atímicos, 400 μ L de Matrigel desprovisto de factor de crecimiento (Becton Dickinson) suplementado con PBS, 20 nM VEGF o 250 nM de TyrRS, mini TyrRS, TyrRS-Y341A o mini TyrRS-Y341A. Cinco días después, se inyectó lectina de unión a endotelio *Griffonia* (Bandeiraea) *Simplicifolia* I marcada con fluoresceína, isolectina B4 (GSL-B4) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) de forma intravenosa a los ratones. Los implantes de Matrigel se extirparon y se homogeneizaron en tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA) (10 nM fosfato de sodio, pH 7,4, 150 nM cloruro de sodio, 1% Nonidet P-40, 0,5% deoxicolato de sodio, 0,1% dodecilsulfato de sodio). Después de la homogeneización, se cuantificó el contenido de fluoresceína de cada implante mediante análisis espectrofotométrico.

Ensayo de migración de células endoteliales. Se sembraron células endoteliales de la vena del cordón umbilical humanas (HUVEC) (Cambrex) a una densidad de aproximadamente 3×10^5 células/pocillo de una placa de 6 pocillos en medio EGM (Cambrex) conteniendo 10% de suero fetal bovino (FBS) y se crecieron hasta obtener monocapas confluentes. Las células fueron privadas de suero en medio no conteniendo FBS durante 16 horas y heridas transversalmente a través del pocillo con una punta de pipeta. Las capas heridas se lavaron dos veces con medio libre de suero para eliminar los restos celulares, y se dejó que las células migraran en presencia y ausencia de variantes de TyrRS y de factores de control. Imágenes del área de la herida libre de células fueron tomadas a 0 y 6 horas tras la herida y se analizaron utilizando un software de análisis de imagen (NIH ImageJ 1.33). La migración de células endoteliales se calculó como el porcentaje del área libre de células restante en comparación con el área de la herida inicial, a partir del cual se determinó el porcentaje de área cerrada para cada condición.

Activación de aminoácidos. La activación de aminoácidos se probó mediante una reacción de intercambio de ATP-pirofosfato (PPi). Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C en un tampón conteniendo Tris-HCl (100 mM, pH 7,8), KF (10 mM), $MgCl_2$ (2 mM), ATP (1 mM), BSA (0,1 mg/mL), NaPPi (2 mM, 130 cpm/nmol), beta-mercaptoetanol (5 mM), tirosina (2 mM) y 200 nM del polipéptido.

Resultados y discusión

El residuo Y341 de TyrRS aseguró la estructura alrededor del motivo ELR. Se sabe que mini-TyrRS (por ejemplo, residuos de aminoácido 1-364 de la TyrRS humana), pero no la TyrRS de longitud completa, actúa como una citoquina proangiogénica. La actividad proangiogénica es dependiente de la presencia de un motivo ELR que también está presente en las quimioquinas CXC como IL-8, y es un requisito para su actividad. En el Panel Superior

de la Figura 3 se muestra una representación esquemática de la secuencia de aminoácidos de TyrRS que comprende 3 dominios, el dominio catalítico de plegamiento de Rossmann (amarillo, residuos 1-230), el dominio de reconocimiento de anticodón (verde, residuos 231-364) y el dominio C-terminal (violeta, residuos 364-528). Los dos primeros dominios forman la enzima principal activa que se denomina mini TyrRS (1-364). La estructura terciaria de mini-TyrRS, resuelta recientemente, revela una red de uniones de puente de hidrógeno alrededor del motivo ELR que sujeta los dominios de reconocimiento de anticodón y de sitio activo de la proteína (ver Figura 3, Panel Inferior). Hay dos interacciones por puente de hidrógeno entre la cadena lateral de R63 del motivo ELR y la cadena principal de A340 del dominio de reconocimiento de anticodón que sujetan la hélice $\alpha 5$ a la hélice $\alpha 14$. Adicionalmente, interacciones de apilamiento entre el anillo aromático de Y341 y la cadena principal de G46 crean un contacto entre estos dominios. De entre estos cuatro residuos, R93, G46 y Y341 están conservados en todas las proteínas TyrRS eucarióticas que han sido identificadas hasta la fecha. Como se muestra en la Figura 3 (Panel Inferior), la complementariedad de la superficie electroestática de cada fragmento proporciona una prueba de la sujeción entre la hélice $\alpha 5$ y la hélice $\alpha 14$. El motivo ELR (en la hélice $\alpha 5$) está enmascarado por el dominio C-terminal y está expuesto cuando el dominio C-terminal se elimina. Por esta razón, la mini TyrRS es activa, mientras que la TyrRS de longitud completa es inactiva en cuanto a angiogénesis. El residuo Tyr341 (en la hélice $\alpha 14$ del dominio de reconocimiento de anticodón) interacciona con el ELR y juega un papel importante sujetando el dominio C-terminal para bloquear el ELR. La A340 también está muy conservada, estando remplazada únicamente por otro aminoácido pequeño, la glicina, en *S. cerevisiae*.

Se utilizaron dos procedimientos independientes para demostrar la apertura de la estructura tridimensional de TyrRS debido a la mutación Y341A. El primer procedimiento fue la difracción de rayos X de ángulo pequeño (SAXS). Cuando la longitud de onda de la radiación electromagnética está en la misma escala que la de una partícula de la muestra, la partícula va a difractar la radiación. La detección y el análisis de esta difracción pueden proporcionar información valiosa sobre el tamaño, la forma y la estructura interna de la partícula. La técnica SAXS es una técnica poderosa para detectar cambios conformacionales globales en macromoléculas (como proteínas) en solución. A partir de las curvas de difracción medidas en ambas, la TyrRS humana de tipo salvaje y la mutación Y341A, la función de distribución de las distancias entre pares de electrones ($D_{\max}$) se calculó para cada muestra (Figura 5). Los valores del Radio de Giro (R_g) y de Distancia máxima ($D_{\max}$) se derivaron subsiguientemente de las funciones de distribución, $P(r)$.

La Figura 4 muestra la sujeción por puente de hidrógeno entre R93 y Y341. La disrupción de la sujeción por puente de hidrógeno abre la estructura terciaria y expone el motivo ELR. Estudios de difracción de rayos X de ángulo pequeño en la TyrRS humana de tipo salvaje y en una variante en la que Y341 ha sido reemplazado por una alanina (TyrRS-Y341A) proporciona una prueba directa de tal apertura (ver Figura 5). Los estudios de difracción de rayos X mostraron que la distribución de las distancias entre pares de electrones se ensanchó en la variante con respecto a la proteína de tipo salvaje. La TyrRS Y341A tiene un R_g aproximadamente 4 angstroms mayor que el de la TyrRS de tipo salvaje, y una $D_{\max}$ aproximadamente 20 angstroms mayor. Esto demuestra que la TyrRS Y341A tiene una conformación más abierta y más extendida con respecto a la TyrRS de tipo salvaje.

A partir de estudios de digestión utilizando plasmina y elastasa se obtuvo un sustento adicional para la hipótesis de una estructura abierta en la TyrRS-Y341A con respecto a la TyrRS humana de tipo salvaje. Generalmente, las proteasas cortan las proteínas en regiones de bucle flexibles en las que no hay definidas estructuras secundarias como hélices alfa o láminas beta. La presencia de una apertura estructural para exponer el motivo ELR asociada con la mutación Y341A fue confirmada por los fragmentos de rotura adicionales que se observaron como resultado de sitio(s) de corte adicionales en la estructura abierta más relajada. Utilizando ambas, la plasmina y la elastasa de leucocito, se observaron sitios de corte adicionales en la mutación Y341A con respecto a la TyrRS de tipo salvaje. Los sitios de corte adicionales observados fueron L333, K334 y A337, todos ellos localizados en la hélice alfa 14 del dominio de reconocimiento de anticodón, cerca del sitio de mutación 341. Esto confirmó que en la mutación Y341A, alfa 14 está relajada y se presenta como un bucle flexible que ya no está unido a la región ELR. La Figura 6 ilustra esquemáticamente el efecto de apertura de la mutación Y341A sobre la estructura terciaria global de la TyrRS humana.

La mutación Y341A confirió una actividad angiogénica a la TyrRS de longitud completa. Y341 es una diana ideal para una mutación dada su conservación entre los eucariotas y su implicación en la estabilidad de la estructura terciaria en la región alrededor del motivo ELR. Este residuo se mutó a alanina en la TyrRS de longitud completa y en mini-TyrRS para determinar hasta que punto la disrupción de la fijación altera las actividades citoquina y enzimática. La actividad citoquina se probó en la membrana corioalantoidea de pollo (CAM) y ensayos de angiogénesis en Matrigel.

La inclusión de la mutación Y341A en mini-TyrRS no produjo un efecto observable sobre su actividad en el ensayo CAM – la angiogénesis fue promovida por ambos, el polipéptido normal y la variante. La TyrRS humana de tipo salvaje y de longitud completa es inactiva en este ensayo. Sin embargo, la mutación de Y341A de la TyrRS humana a alanina (por ejemplo, TyrRS-Y341A) convirtió esta enzima en una citoquina proangiogénica. Para confirmar los resultados observados en el ensayo CAM, también se probaron los polipéptidos en el modelo de ratón con implantes de Matrigel. En este ensayo, un implante de colágeno o de otra proteína conteniendo PBS se inyectó de forma subcutánea. Cuando el implante contiene un factor proangiogénico, los vasos sanguíneos se extienden dentro del

implante. Mediante la inyección de una lectina de unión a células endoteliales fluorescente, la densidad de los vasos sanguíneos en cada implante puede ser cuantificada mediante análisis espectrofotométrico. En este modelo, VEGF y la mini-TyrRS fueron ambos positivos para actividad angiogénica. La TyrRS de tipo salvaje fue inactiva, con niveles de angiogénesis similares al PBS. En contraste, la TyrRS-Y341A indujo angiogénesis. Estos datos confirmaron de forma independiente los resultados de los ensayos CAM.

La variante de TyrRS que tiene la mutación Y341A provocó un aumento marcado de la vascularización del área de la membrana CAM que contenía el implante mientras que ni el polipéptido de tipo salvaje, ni el PBS, indujeron una respuesta (los polipéptidos se aplicaron a una concentración de 1 μ M en un implante de colágeno con una malla de nylon embebida).

Asimismo, la Figura 7 caracteriza la actividad *in vivo* de los polipéptidos de TyrRS en el ensayo de implantes de Matrigel en ratón. Se administró a ratones una inyección de 400 μ L de Matrigel desprovisto de factor de crecimiento solo o mezclado con 250 nM de proteína. Después de una incubación de cinco días, los implantes se retiraron y se evaluó la presencia de vasos sanguíneos. VEGF₁₆₅ (20 nM) fue utilizado como control positivo. Como se ha reportado anteriormente, en este ensayo la mini-TyrRS promovió una respuesta angiogénica. La mutación de Y341 a alanina en la mini-TyrRS (por ejemplo, mini-TyrRS-Y341A) no afectó a esta respuesta. Sin embargo, cuando la mutación Y341 se realiza en la TyrRS de longitud completa, se notó un aumento del doble en la respuesta angiogénica en comparación con la TyrRS de tipo salvaje.

La mutación Y341A inactivó la habilidad de TyrRS de activar la tirosina. La activación de aminoácidos se evaluó mediante la medición de la reacción de intercambio de ATP-PPi dependiente de tirosina. Como se muestra en la Figura 8, la mutación puntual Y341A suprime la habilidad de la TyrRS de longitud completa, así como de mini-TyrRS, de formar el tirosil-adenilato. De este modo, los elementos estructurales que están implicados en la aminoacilación de ARNt son diferentes de los que están implicados en la función citoquina.

Se utilizó un ensayo de migración de células endoteliales para evaluar la habilidad de las variantes de TyrRS de la invención para estimular la migración de células endoteliales, que está asociada con la curación de heridas. Células endoteliales de la vena del cordón umbilical humanas (HUVECs) se sembraron en placa en medio EGM conteniendo 10% de FBS y se crecieron hasta obtener monocapas confluentes. Las células fueron privadas de suero en medio no conteniendo FBS y, posteriormente, se hirieron transversalmente a través del pocillo con una punta de pipeta. Las capas heridas se lavaron con medio libre de suero para eliminar restos celulares, y se dejó que las células migraran en presencia y ausencia de variantes TyrRS y de factores de control. Se tomaron imágenes del área libre de células a las 0 y 6 horas tras la herida y se analizaron utilizando un software de análisis de imagen (NIH ImageJ, versión 1.33). La migración de células endoteliales se calculó como porcentaje del área libre de células restante en comparación con el área de la herida inicial, a partir del cual se determinó el porcentaje de área cerrada para cada condición. La Figura 9 muestra un gráfico de los porcentajes (eje vertical) del área libre de células restante comparado con el área inicial de la herida en cultivos de células endoteliales heridos tratados con las variantes de TyrRS de la invención y con tratamientos control. Un porcentaje relativamente pequeño de área libre de células indica una migración de células endoteliales y una curación de la herida mejoradas. Como se muestra en la Figura 9, las variantes de TyrRS de la invención estimularon la migración de células endoteliales a un nivel comparable con la mini-TyrRS, y a un nivel superior que la TyrRS de tipo salvaje.

Listado de secuencias

<110> YANG, Xiang-Lei

- 5 <120> tirosil-ARNt sintetasa angiogénica
Composiciones y procedimientos

<130> TSRI 1163.1 PCT

- 10 <150> US 60/741,580
<151> 2005-12-02

<160> 26

- 15 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

- 20 <213> Homo sapiens

<400> 1

His Ile Gly His

1

- 25 <210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

- 30 <400> 2

Lys Met Ser Lys Ser

1

5

<210> 3

- 35 <211> 528

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Gly Asp Ala Pro Ser Pro Glu Glu Lys Leu His Leu Ile Thr Arg

1

5

10

15

Asn Leu Gln Glu Val Leu Gly Glu Glu Lys Leu Lys Glu Ile Leu Lys

20

25

30

Glu Arg Glu Leu Lys Ile Tyr Trp Gly Thr Ala Thr Thr Gly Lys Pro

35

40

45

His Val Ala Tyr Phe Val Pro Met Ser Lys Ile Ala Asp Phe Leu Lys

50

55

60

Ala Gly Cys Glu Val Thr Ile Leu Phe Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu

- 40

65

70

75

80

Asp Asn Met Lys Ala Pro Trp Glu Leu Leu Glu Leu Arg Val Ser Tyr

85

90

95

Tyr Glu Asn Val Ile Lys Ala Met Leu Glu Ser Ile Gly Val Pro Leu

100

105

110

Glu Lys Leu Lys Phe Ile Lys Gly Thr Asp Tyr Gln Leu Ser Lys Glu

115

120

125

Tyr Thr Leu Asp Val Tyr Arg Leu Ser Ser Val Val Thr Gln His Asp

130

135

140

Ser Lys Lys Ala Gly Ala Glu Val Val Lys Gln Val Glu His Pro Leu

145

150

155

160

Leu Ser Gly Leu Leu Tyr Pro Gly Leu Gln Ala Leu Asp Glu Glu Tyr

165

170

175

Leu Lys Val Asp Ala Gln Phe Gly Gly Ile Asp Gln Arg Lys Ile Phe

180

185

190

```

Thr Phe Ala Glu Lys Tyr Leu Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Lys Arg Val
      195              200              205
His Leu Met Asn Pro Met Val Pro Gly Leu Thr Gly Ser Lys Met Ser
      210              215              220
Ser Ser Glu Glu Glu Ser Lys Ile Asp Leu Leu Asp Arg Lys Glu Asp
      225              230              235              240
Val Lys Lys Lys Leu Lys Lys Ala Phe Cys Glu Pro Gly Asn Val Glu
      245              250              255
Asn Asn Gly Val Leu Ser Phe Ile Lys His Val Leu Phe Pro Leu Lys
      260              265              270
Ser Glu Phe Val Ile Leu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Gly Asn Lys Thr
      275              280              285
Tyr Thr Ala Tyr Val Asp Leu Glu Lys Asp Phe Ala Ala Glu Val Val
      290              295              300
His Pro Gly Asp Leu Lys Asn Ser Val Glu Val Ala Leu Asn Lys Leu
      305              310              315              320
Leu Asp Pro Ile Arg Glu Lys Phe Asn Thr Pro Ala Leu Lys Lys Leu
      325              330              335
Ala Ser Ala Ala Tyr Pro Asp Pro Ser Lys Gln Lys Pro Met Ala Lys
      340              345              350
Gly Pro Ala Lys Asn Ser Glu Pro Glu Glu Val Ile Pro Ser Arg Leu
      355              360              365
Asp Ile Arg Val Gly Lys Ile Ile Thr Val Glu Lys His Pro Asp Ala
      370              375              380
Asp Ser Leu Tyr Val Glu Lys Ile Asp Val Gly Glu Ala Glu Pro Arg
      385              390              395              400
Thr val Val Ser Gly Leu Val Gln Phe Val Pro Lys Glu Glu Leu Gln
      405              410              415
Asp Arg Leu Val Val Leu Cys Asn Leu Lys Pro Gln Lys Met Arg
      420              425              430
Gly Val Glu Ser Gln Gly Met Leu Leu Cys Ala Ser Ile Glu Gly Ile
      435              440              445
Asn Arg Gln Val Glu Pro Leu Asp Pro Pro Ala Gly Ser Ala Pro Gly
      450              455              460
Glu His Val Phe Val Lys Gly Tyr Glu Lys Gly Gln Pro Asp Glu Glu
      465              470              475              480
Leu Lys Pro Lys Lys Lys Val Phe Glu Lys Leu Gln Ala Asp Phe Lys
      485              490              495
Ile Ser Glu Glu Cys Ile Ala Gln Trp Lys Gln Thr Asn Phe Met Thr
      500              505              510
Lys Leu Gly Ser Ile Ser Cys Lys Ser Leu Lys Gly Gly Asn Ile Ser
      515              520              525

```

<210> 4
 5 <211> 528
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Variante de la TyrRS humana
 <221> VARIANTE
 <222> 341
 <223> Xaa = Gly, Ala, Phe, Val, Leu, Ile, Met, o Pro

<400> 4

```

Met Gly Asp Ala Pro Ser Pro Glu Glu Lys Leu His Leu Ile Thr Arg
 1           5           10           15
Asn Leu Gln Glu Val Leu Gly Glu Glu Lys Leu Lys Glu Ile Leu Lys
 20           25           30
Glu Arg Glu Leu Lys Ile Tyr Trp Gly Thr Ala Thr Thr Gly Lys Pro
 35           40           45
His Val Ala Tyr Phe Val Pro Met Ser Lys Ile Ala Asp Phe Leu Lys
 50           55           60
Ala Gly Cys Glu Val Thr Ile Leu Phe Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu
 65           70           75           80
Asp Asn Met Lys Ala Pro Trp Glu Leu Leu Glu Leu Arg Val Ser Tyr
 85           90           95
Tyr Glu Asn Val Ile Lys Ala Met Leu Glu Ser Ile Gly Val Pro Leu
 100          105          110
Glu Lys Leu Lys Phe Ile Lys Gly Thr Asp Tyr Gln Leu Ser Lys Glu
 115          120          125
Tyr Thr Leu Asp Val Tyr Arg Leu Ser Ser Val Val Thr Gln His Asp
 130          135          140
Ser Lys Lys Ala Gly Ala Glu Val Val Lys Gln Val Glu His Pro Leu
 145          150          155          160
Leu Ser Gly Leu Leu Tyr Pro Gly Leu Gln Ala Leu Asp Glu Glu Tyr
 165          170          175
Leu Lys Val Asp Ala Gln Phe Gly Gly Ile Asp Gln Arg Lys Ile Phe
 180          185          190
Thr Phe Ala Glu Lys Tyr Leu Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Lys Arg Val
 195          200          205
His Leu Met Asn Pro Met Val Pro Gly Leu Thr Gly Ser Lys Met Ser
 210          215          220
Ser Ser Glu Glu Glu Ser Lys Ile Asp Leu Leu Asp Arg Lys Glu Asp
 225          230          235          240
Val Lys Lys Lys Leu Lys Lys Ala Phe Cys Glu Pro Gly Asn Val Glu
 245          250          255
Asn Asn Gly Val Leu Ser Phe Ile Lys His Val Leu Phe Pro Leu Lys
 260          265          270
Ser Glu Phe Val Ile Leu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Gly Asn Lys Thr
 275          280          285
Tyr Thr Ala Tyr Val Asp Leu Glu Lys Asp Phe Ala Ala Glu Val Val
 290          295          300
His Pro Gly Asp Leu Lys Asn Ser Val Glu Val Ala Leu Asn Lys Leu
 305          310          315          320
Leu Asp Pro Ile Arg Glu Lys Phe Asn Thr Pro Ala Leu Lys Lys Leu
 325          330          335
Ala Ser Ala Ala Xaa Pro Asp Pro Ser Lys Gln Lys Pro Met Ala Lys
 340          345          350
Gly Pro Ala Lys Asn Ser Glu Pro Glu Glu Val Ile Pro Ser Arg Leu
 355          360          365
Asp Ile Arg Val Gly Lys Ile Ile Thr Val Glu Lys His Pro Asp Ala
 370          375          380
Asp Ser Leu Tyr Val Glu Lys Ile Asp Val Gly Glu Ala Glu Pro Arg
 385          390          395          400
Thr Val Val Ser Gly Leu Val Gln Phe Val Pro Lys Glu Glu Leu Gln
 405          410          415
Asp Arg Leu Val Val Val Leu Cys Asn Leu Lys Pro Gln Lys Met Arg
 420          425          430
Gly Val Glu Ser Gln Gly Met Leu Leu Cys Ala Ser Ile Glu Gly Ile
 435          440          445
Asn Arg Gln Val Glu Pro Leu Asp Pro Pro Ala Gly Ser Ala Pro Gly
 450          455          460
Glu His Val Phe Val Lys Gly Tyr Glu Lys Gly Gln Pro Asp Glu Glu
 465          470          475          480
Leu Lys Pro Lys Lys Lys Val Phe Glu Lys Leu Gln Ala Asp Phe Lys
 485          490          495

```

ES 2 528 663 T3

Ile	Ser	Glu	Glu	Cys	Ile	Ala	Gln	Trp	Lys	Gln	Thr	Asn	Phe	Met	Thr
			500					505					510		
Lys	Leu	Gly	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Leu	Lys	Gly	Gly	Asn	Ile	Ser
		515					520					525			

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

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

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Trp Glu Leu Leu Glu Leu Arg Val Ser Tyr Tyr
 1 5 10

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

<400> 7
 Ala Ser Ala Ala Tyr Pro Asp Pro Ser Lys
 1 5 10

<210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 8
 Trp Asp Val Leu Glu Leu Arg Thr Ser Tyr Tyr
 1 5 10

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 9
 Ser Ser Ala Ala Tyr Pro Asp Pro Ser Lys
 1 5 10

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Drosophila melanogaster

<400> 10
 Trp Ser Leu Leu Glu Leu Arg Thr Lys Tyr Tyr
 1 5 10

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Drosophila melanogaster

<400> 11
 Ser Ala Ala Ala Tyr Pro Pro Pro Ala Lys
 1 5 10

5 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Caenorhabditis elegans

10 <400> 12
 Tyr Trp Gly Thr Ala Thr Thr Gly Lys Pro His Val Gly Tyr Leu Val
 1 5 10 15
 Pro

15 <210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Caenorhabditis elegans

20 <400> 13
 Trp Glu Leu Leu Lys Cys Arg Val Ile Tyr Tyr
 1 5 10

25 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Caenorhabditis elegans

30 <400> 14
 Lys Glu Lys Gly Tyr Asn His Ser Thr Asp
 1 5 10

35 <210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae

40 <400> 15
 Tyr Trp Gly Thr Ala Pro Thr Gly Arg Pro His Cys Gly Tyr Phe Val
 1 5 10 15
 Pro

45 <210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae

50 <400> 16
 Leu Glu Val Val Asn Tyr Arg Ala Lys Tyr Tyr
 1 5 10

55 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae

50 <400> 17
 Ser Glu Lys Gly Tyr Pro Val Ala Thr Pro
 1 5 10

55 <210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces pombe

<400> 18
 Tyr Trp Gly Ser Ala Pro Thr Gly Arg Pro His Cys Gly Tyr Phe Val
 1 5 10 15
 Pro

5 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces pombe

10 <400> 19
 Met Glu Leu Val Gln His Arg Val Arg Tyr Tyr
 1 5 10

15 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces pombe

20 <400> 20
 Leu Lys Ala Ala Tyr Pro Asp Pro Lys Asp
 1 5 10

25 <210> 21
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

30 <400> 21
 Tyr Cys Gly Phe Asp Pro Thr Ala Asp Ser Leu His Leu Gly His Leu
 1 5 10 15
 Val Pro

35 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

40 <400> 22
 Leu Asn Thr Glu Glu Thr Val Gln Glu Trp Val
 1 5 10

45 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

50 <400> 23
 Asp Gly Val Pro Met Val Glu Met Glu
 1 5

55 <210> 24
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

50 <400> 24
 Tyr Ser Gly Phe Asp Pro Thr Ala Asp Ser Leu His Ile Gly His Leu
 1 5 10 15
 Leu Pro

55 <210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

ES 2 528 663 T3

<400> 25
Leu Asn Thr Ala Asp Ile Val Ser Glu Trp Ser
1 5 10

5 <210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Bacillus subtilis

10 <400> 26
Asp Val Pro Ser Met Glu Val Asp Ser Thr
1 5 10

15

REIVINDICACIONES

1. Variante polipeptídica de tirosil-ARNt sintetasa (TyrRS) aislada, que comprende:

(a) una región de plegamiento de Rossmann o una porción de la misma que incluye una hélice $\alpha 5$;

y

(b) un dominio de reconocimiento de anticodón o una porción del mismo que incluye una hélice $\alpha 14$;

en la que la variante tiene una identidad de secuencia de residuos de aminoácido de por lo menos el 50% en comparación con la secuencia de residuos de aminoácido de la TyrRS humana (SEC ID nº: 3), incluye por lo menos una sustitución no conservativa de residuos de aminoácidos de un residuo de aminoácido en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 46, 340 y 341 de la SEC ID nº: 3 y presenta una actividad angiogénica que es mayor que la actividad angiogénica de la TyrRS humana.

2. Variante polipeptídica de TyrRS según la reivindicación 1, que incluye un residuo de aminoácido no polar en la posición correspondiente al residuo 341 de la SEC ID nº: 3.

3. Variante polipeptídica de TyrRS según la reivindicación 1, que incluye un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral voluminosa no polar en la posición correspondiente a la posición 46 de la SEC ID nº: 3.

4. Variante polipeptídica de TyrRS según la reivindicación 1, que incluye un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral voluminosa no polar en la posición correspondiente a la posición 340 de la SEC ID nº: 3.

5. Variante polipeptídica de TyrRS según la reivindicación 2, en la que la hélice $\alpha 5$ incluye un motivo ELR, cuyo motivo ELR está espaciado por lo menos aproximadamente 6 angstroms de la hélice $\alpha 14$ en la estructura terciaria de la variante, según lo determinado por la separación espacial entre el carbono alfa de cualquier residuo de aminoácido de la hélice $\alpha 14$ y el carbono alfa de cualquier residuo de aminoácido del motivo ELR de la hélice $\alpha 5$; y en la que la variante presenta un motivo ELR expuesto en una porción externa de la estructura terciaria del polipéptido.

6. Variante polipeptídica de TyrRS según la reivindicación 5, en la que el residuo de aminoácido no polar tiene una cadena lateral alifática.

7. Variante polipeptídica de TyrRS según la reivindicación 5, en la que el residuo de aminoácido no polar se selecciona de entre el grupo formado por un residuo de glicina, un residuo de alanina, un residuo de fenilalanina, un residuo de valina, un residuo de leucina, un residuo de isoleucina, un residuo de metionina y un residuo de prolina.

8. Variante polipeptídica de TyrRS según las reivindicaciones 1 o 5, en la que la variante tiene una identidad de secuencia de residuos de aminoácido de por lo menos 80% en comparación con la secuencia de residuos de aminoácido de la TyrRS humana (SEC ID nº: 3).

9. Variante polipeptídica de TyrRS según las reivindicaciones 1 o 5, en la que la variante tiene una identidad de secuencia de residuos de aminoácido de por lo menos 95% en comparación con la secuencia de residuos de aminoácido de la TyrRS humana (SEC ID nº: 3).

10. Variante polipeptídica de TyrRS según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de residuos de aminoácido de SEC ID nº: 4 o un fragmento de la misma, incluyendo por lo menos los residuos 1 a 364 de SEC ID nº: 4, siendo el residuo X en la posición 341 de SEC ID nº: 4 seleccionado de entre el grupo formado por un residuo de glicina, un residuo de alanina, un residuo de valina, un residuo de leucina, un residuo de isoleucina, un residuo de metionina y un residuo de prolina.

11. Variante polipeptídica de TyrRS según la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de residuos de aminoácidos de SEC ID nº: 4, siendo el residuo X en la posición 341 de SEC ID nº: 4 seleccionado de entre el grupo formado por un residuo de glicina, un residuo de alanina, un residuo de fenilalanina, un residuo de valina, un residuo de leucina, un residuo de isoleucina, un residuo de metionina y un residuo de prolina.

12. Variante polipeptídica de TyrRS según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en la estimulación de la angiogénesis en un tejido de un mamífero.

13. Variante polipeptídica de TyrRS según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el favorecimiento de la migración de células endoteliales en un tejido de un mamífero.

SEC ID nº: 3

```

1 MGDAPSPEEK LHLITRNLQE VLGEEKLKEI LKERELKIYW GTATTGKPHV AYFVPMSKIA
61 DFLKAGCEVT ILFADLHAYL DNMKAPWELL ELRVSYENV IKAMLESIGV PLEKLKFIKG
121 TDYQLSKEYT LDVYRLSSVV TQHDSKKAGA EVVKQVEHPL LSGLLYPGLQ ALDEEYLKVD
181 AQFGGIDQRK IFTFAEKYLP ALGYSKRVHL MNPMVPGLTG SKMSSSEES KIDLLDRKED
241 VKKKLKKAFK EPGNVENNGV LSFIKHVLFP LKSEFVILRD EKWGGNKTYT AYVDLEKDFA
301 AEVVHPGDLK NSVEVALNKL LDPIREKFNT PALKKLASAA YPDPSKQKPM AKGPAKNSEP
361 EEVIPSRLDI RVGKIITVEK HPDADSLYVE KIDVGEAEPR TVVSGLVQFV PKEELQDRLV
421 VVLCNLKPQK MRGVESQGML LCASIEGINR QVEPLDPPAG SAPGEHVFK GYEKGQPDEE
481 LKPKKKVFKE LQADFKISEE CIAQWKQTNF MTKLGSISCK SLKGGNIS

```

Figura 1.

SEC ID nº: 4

```

1 MGDAPSPEEK LHLITRNLQE VLGEEKLKEI LKERELKIYW GTATTGKPHV AYFVPMSKIA
61 DFLKAGCEVT ILFADLHAYL DNMKAPWELL ELRVSYENV IKAMLESIGV PLEKLKFIKG
121 TDYQLSKEYT LDVYRLSSVV TQHDSKKAGA EVVKQVEHPL LSGLLYPGLQ ALDEEYLKVD
181 AQFGGIDQRK IFTFAEKYLP ALGYSKRVHL MNPMVPGLTG SKMSSSEES KIDLLDRKED
241 VKKKLKKAFK EPGNVENNGV LSFIKHVLFP LKSEFVILRD EKWGGNKTYT AYVDLEKDFA
301 AEVVHPGDLK NSVEVALNKL LDPIREKFNT PALKKLASAA XPDPSKQKPM AKGPAKNSEP
361 EEVIPSRLDI RVGKIITVEK HPDADSLYVE KIDVGEAEPR TVVSGLVQFV PKEELQDRLV
421 VVLCNLKPQK MRGVESQGML LCASIEGINR QVEPLDPPAG SAPGEHVFK GYEKGQPDEE
481 LKPKKKVFKE LQADFKISEE CIAQWKQTNF MTKLGSISCK SLKGGNIS

```

Figura 2.

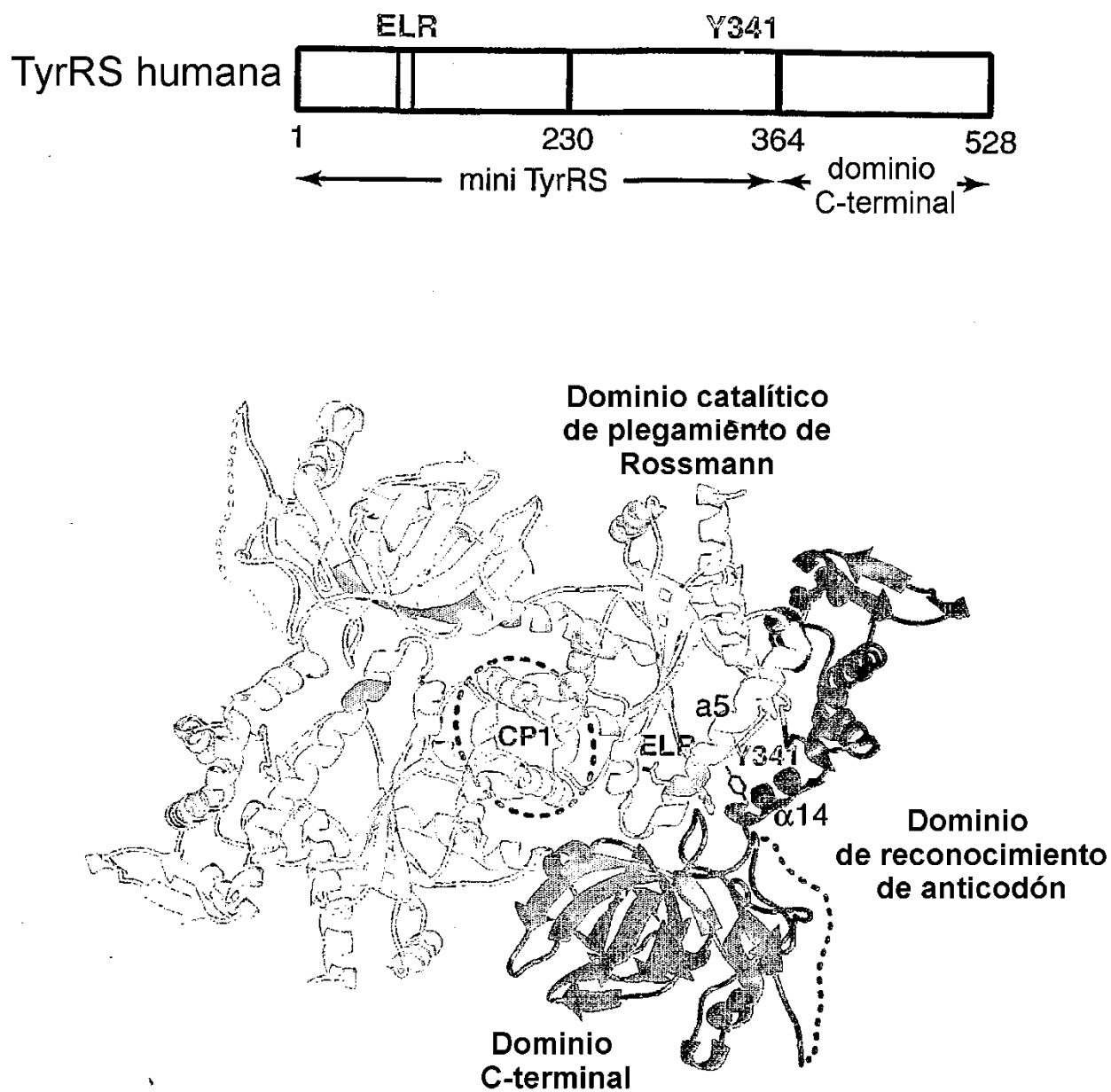
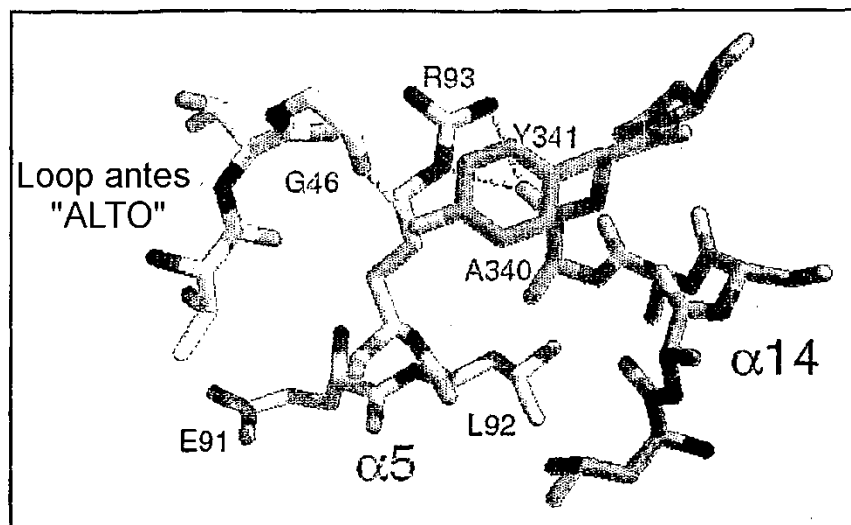


Figura 3.



		REGION 1		REGION 2		REGION 3	
		39	55	87	97	337	346
ROW 1	<i>H.sap</i>	YWG	TATTG-KPHVAYFVP	...	WELLELRVSYY	...	ASAAIPDPSK
ROW 2	<i>M.mus</i>	YWG	TATTG-KPHVAYFVP	...	WELLELRVSYY	...	ASAAIPDPSK
ROW 3	<i>B.tau</i>	YWG	TATTG-KPHVAYFVP	...	WDVLELRVSYY	...	SSAAIPDPSK
ROW 4	<i>D.mel</i>	YWG	TATTG-KPHVAYFVP	...	WSLLELRTKYY	...	SAAAPPPAK
ROW 5	<i>C.ele</i>	YWG	TATTG-KPHVGYLVP	...	WELKCRVIYY	...	KEKGNHSTD
ROW 6	<i>S.cer</i>	YWG	TAPTG-RPHCGYFVP	...	LEVVNIRAKYY	...	SEKAPVATP
ROW 7	<i>S.pom</i>	YWG	SAPTG-RPHCGYFVP	...	MELVQHRVRY	...	LKAAPDPKD
ROW 8	<i>E.col</i>	YCG	FPTADSLHLGHLVP	...	LNTETVQEWV	...	DG-VPMVEME
ROW 9	<i>B.sub</i>	YSG	FPTADSLHIGHLLP	...	LNTADIVSEWS	...	DVPSMEVDST

Figura 4.

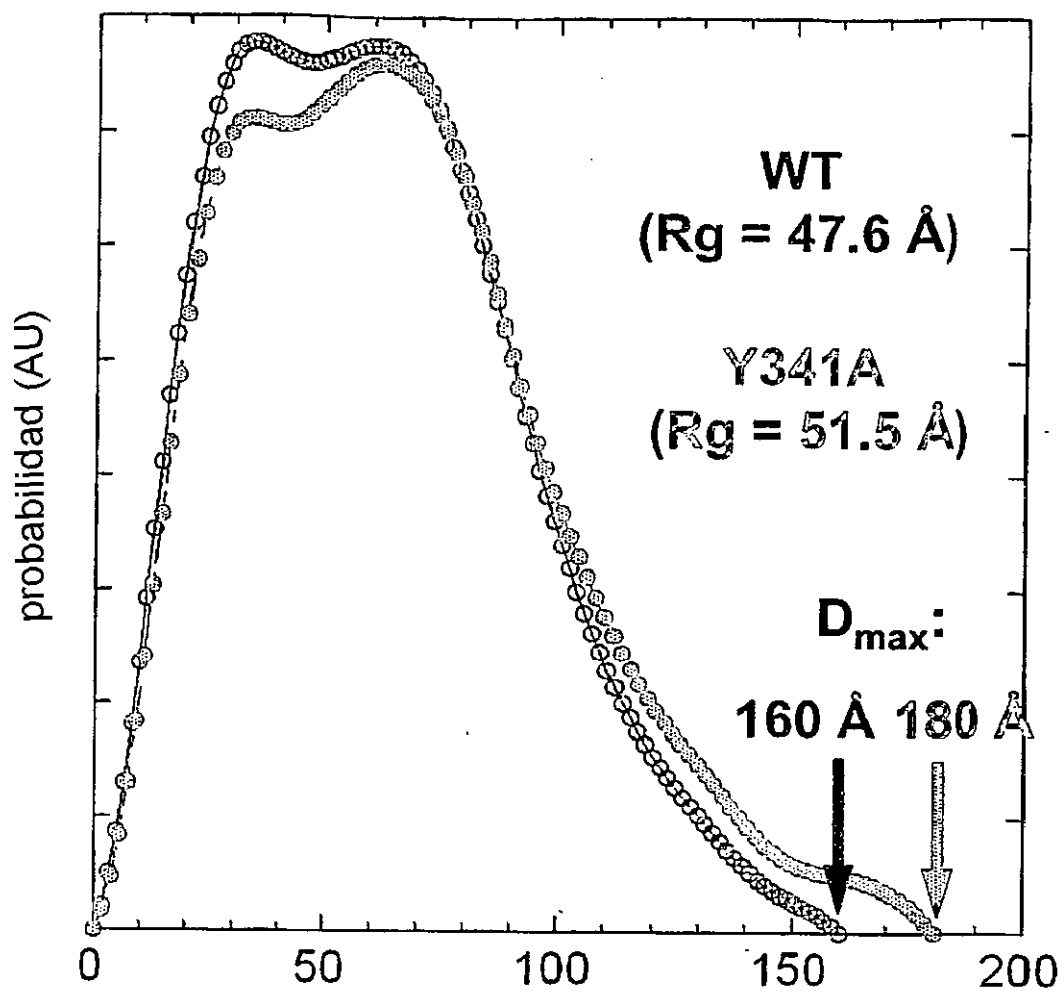
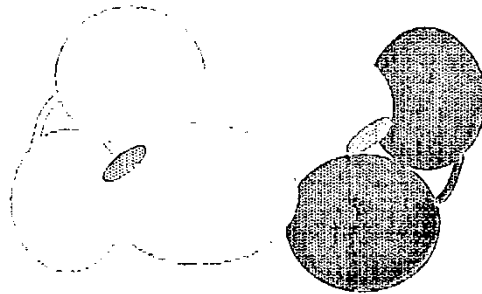


Figura 5.

TyrRS humana nativa con ELR encerrado



Mutación Y341A
u otras variantes de
secuencia

TyrRS humana abierta con ELR expuesto



Figura 6.

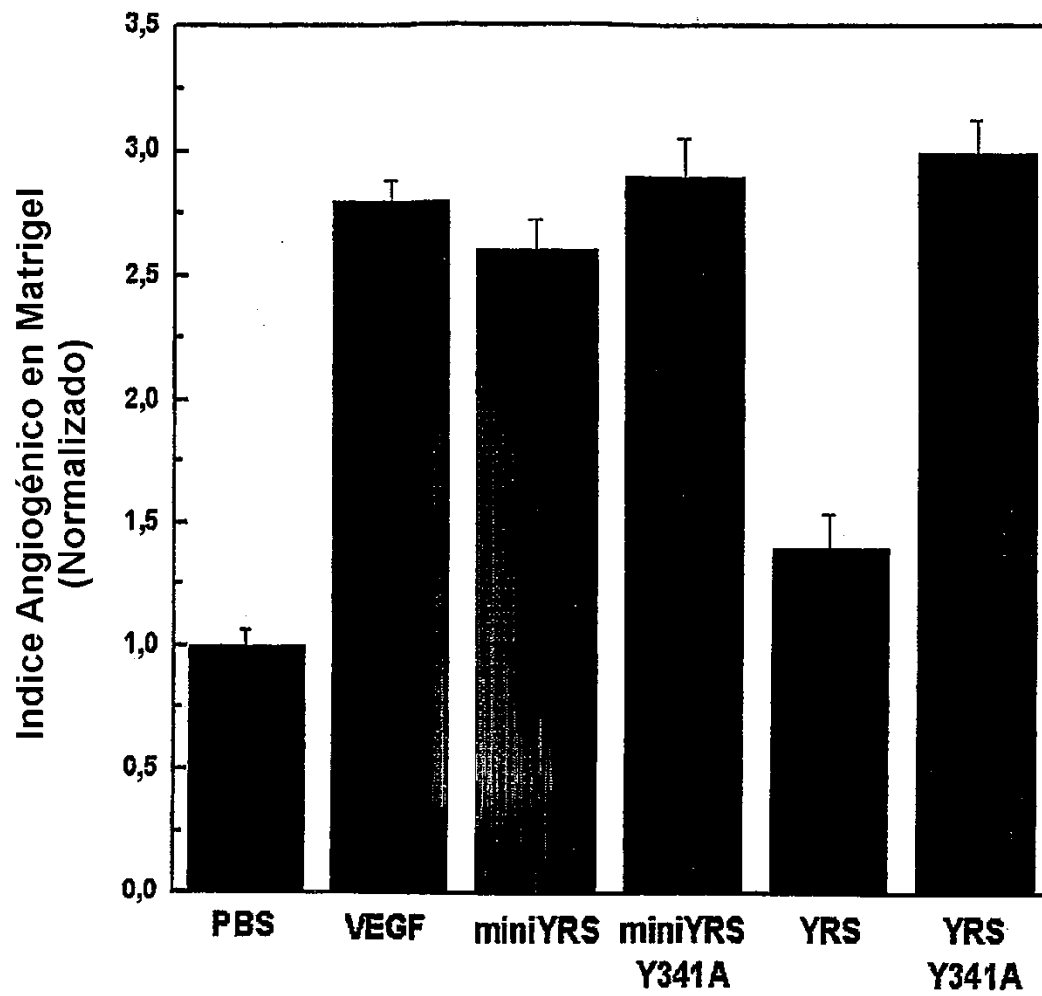


Figura 7.

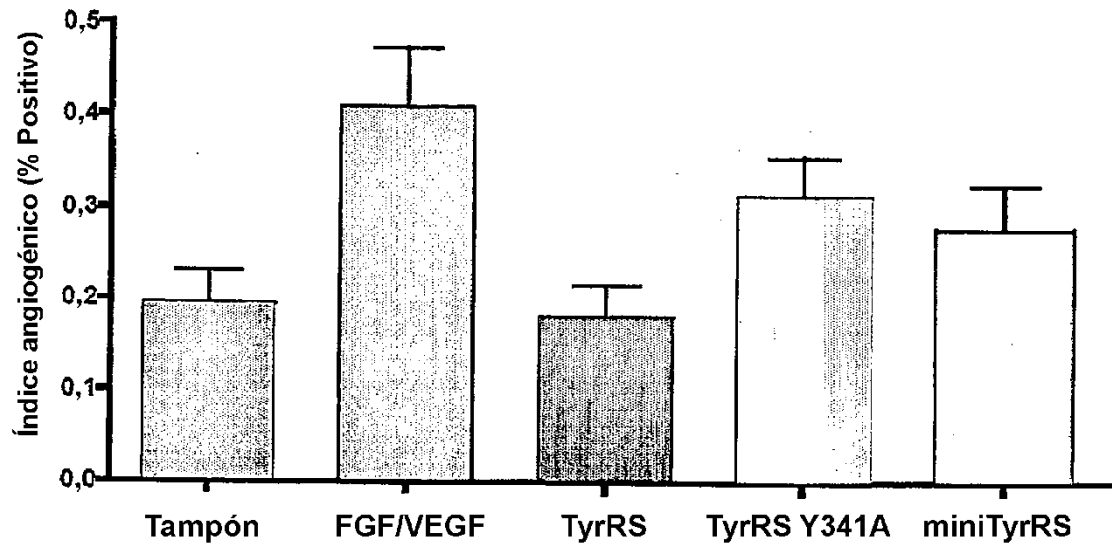


Figura 8.

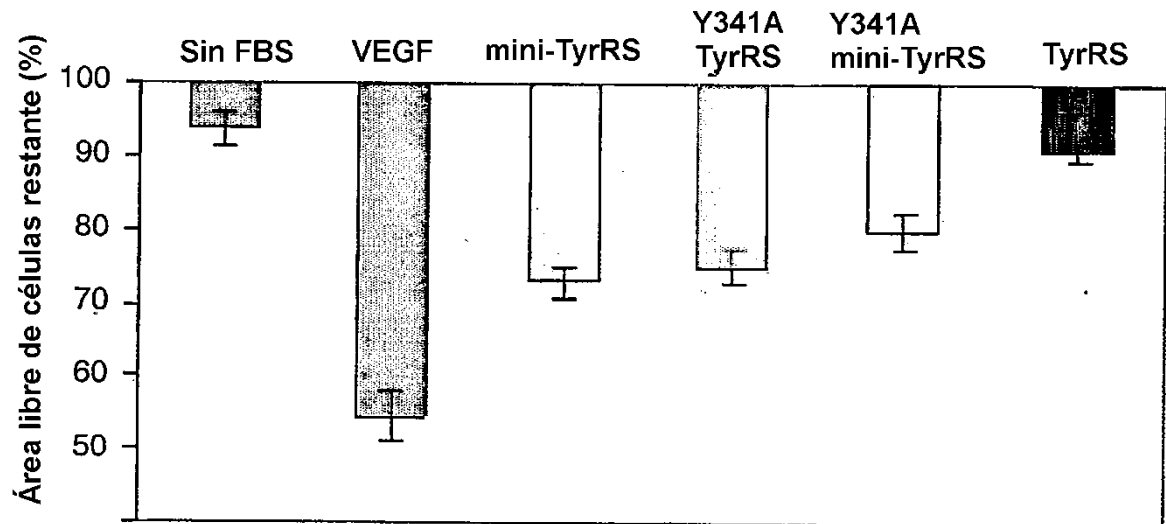


Figura 9.