

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **030418**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.08.31

(21) Номер заявки
201390095

(22) Дата подачи заявки
2011.07.12

(51) Int. Cl. *A61K 38/16* (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

**(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ, ПОЛИПЕПТИД АМИНОАЦИЛ-тРНК-
СИНТЕТАЗЫ (AARS)**

(31) 61/363,581; 61/363,585; 61/363,587

(32) 2010.07.12

(33) US

(43) 2013.06.28

(86) PCT/US2011/043758

(87) WO 2012/021249 2012.02.16

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭЙТИР ФАРМА, ИНК. (US); ПАНЬГУ
БАЙОФАРМА ЛИМИТЕД (CN)**

(72) Изобретатель:
**Грин Лесли Энн, Чжан Кайл П., Хун
Фэй, Вассеро Алан П. (US), Ло Винг-
Сизе (CN), Уоткинс Джеффри Д.,
Куинн Черил Л., Мендлен Джон Д.
(US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20090227002
US-A1-20100028352
WO-A2-02059323
US-A1-20100093082

(57) Изобретение относится к терапевтической композиции для лечения воспалительного заболевания; изолированному полипептиду аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS); клеточной композиции для рекомбинантной продукции полипептида аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS); вектору экспрессии; способу идентификации соединения, которое специфично связывается с полипептидом аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS); способу лечения воспалительного заболевания.

B1**030418****030418****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на настоящий патент испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 61/363581, поданной 12 июля 2010 г.; предварительной заявке на патент США № 61/363585, поданной 12 июля 2010 г.; и предварительной заявке на патент США № 61/363587, поданной 12 июля 2010 г., полное содержание каждой из которых включено в настоящее изобретение посредством ссылки.

Положение относительно перечня последовательностей

Перечень последовательностей, приложенный к настоящему изобретению, представленный в текстовом формате, полностью соответствующем бумажной копии, и, таким образом, включен посредством ссылки. Текстовый файл, содержащий перечень последовательностей, имеет название 120161_450PC_Sequence_Listing.txt. Его размер составляет примерно 150 Кбайт. Указанный файл был создан 8 июля 2011 г. и представлен в электронном виде в системе EFS-Web.

Область техники

Настоящее изобретение в целом относится к композициям, содержащим новые идентифицированные белковые фрагменты аминоксил-тРНК-синтетаз и другие белки, полинуклеотиды, которые их кодируют, и соответствующие комплементарные последовательности и родственные агенты, и к способам их применения в диагностических целях, в целях поиска лекарственных средств, в исследовательских и терапевтических целях.

Уровень техники

Более четырех десятилетий аминоксил-тРНК-синтетаза (AARS) считаются важными белками "домашнего хозяйства" (housekeeping), которые катализируют аминокислирование молекул тРНК в рамках процесса декодирования генетической информации в процессе трансляции белка. AARS интенсивно исследовались в этом аспекте, и многие из их полноразмерных последовательностей клонировали для секвенирования, что обеспечило богатый источник для биохимических экспериментов. Однако некоторые фрагменты AARS, и другие белки, обладают неожиданными видами активности, не связанными с аминокислированием, включая активность во внеклеточной передаче сигнала, модулирующую сигнальные пути не связанным с трансляцией белка образом. В целом указанные неожиданные виды активности не наблюдаются у полноразмерной или исходной последовательности белка; при этом они наблюдаются после удаления или резекции белковых фрагментов AARS из их исходной последовательности или при экспрессии и достаточной очистке фрагмента последовательности AARS и последующего исследования на предмет новых видов активности, не связанных с синтетазной активностью.

Несмотря на то что полноразмерные последовательности AARS известны в течение достаточного времени, не проводилось системного экспериментального анализа для выяснения таких белковых фрагментов AARS или белковых фрагментов из родственных или связанных белков или для оценки возможной роли полноразмерных белков AARS в новых видах биологической активности, не связанных с синтезом аминокислот. В некоторых частях настоящего изобретения, указанные белковые фрагменты AARS, домены AARS или варианты альтернативного сплайсинга AARS называются "резектинами". Термин "резектин" в широком смысле относится к части белка, которая была вырезана или резектирована (путем протеолиза, альтернативного сплайсинга, мутагенеза или рекомбинантной геной инженерии) из контекста его нативной полноразмерной или исходной последовательности белка, которая, в противном случае, часто маскирует ее новые виды биологической активности. Также не было проведено системного экспериментального анализа для исследования применения указанных резектинов в качестве биотерапевтических агентов, диагностических агентов или мишеней лекарственных средств для лечения различных медицинских состояний или анализа их возможной связи с заболеваниями человека. Так как AARS являются важными генами "домашнего хозяйства" с известной функцией у млекопитающих, которая является критичной для жизни, они не рассматривались в качестве мишени для лекарственных средств у млекопитающих, и их не исследовали методом стандартного геномного секвенирования, биоинформатического или подобного анализа для идентификации резектинов, имеющих не синтетазную активность. Также стандартные биохимические исследования не были направлены на характеристику биологических свойств резектинов AARS и их возможного терапевтического и диагностического значения, главным образом, из-за ранее показанной роли соответствующих исходных полноразмерных AARS.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показана доменная структура гистидиламиноксил-тРНК-синтетазы, с относительными положениями и размерами идентифицированных N-концевых полипептидов AARS, показанных схематически. На фиг. 1A представлены фрагменты, идентифицированные с помощью масс-спектрометрического анализа, на фиг. 1B представлены фрагменты, идентифицированные методом глубокого секвенирования транскриптомов, и на фиг. 1C представлены фрагменты, идентифицированные с помощью биоинформатического анализа.

На фиг. 2 показана доменная структура гистидиламиноксил-тРНК-синтетазы с относительными положениями и размерами идентифицированных C-концевых полипептидов AARS, показанных схематически. На фиг. 2A представлены фрагменты, идентифицированные с помощью глубокого секвенирования транскриптомов, и на фиг. 2B представлены фрагменты, идентифицированные с помощью биоинформатического анализа.

На фиг. 3 показана доменная структура гистидиламиноацил-тРНК-синтетазы с относительными положениями и размерами внутренних полипептидов AARS, идентифицированных с помощью биоинформатического анализа.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к терапевтической композиции для лечения воспалительного заболевания, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и изолированный полипептид аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS), который по меньшей мере на 90, 95, 98 или 100% идентичен последовательности SEQ ID NO: 64 или 83 или ее фрагменту, который представляет собой 100 или более смежных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 64 или 83, причем указанный полипептид имеет активность внеклеточной передачи сигнала, выбранную из модуляции высвобождения цитокинов, модуляции клеточной адгезии.

Вариантом настоящего изобретения является терапевтическая композиция, где AARS полипептид слит с гетерологичным полипептидом, выбранным из группы, состоящей из меток аффинной очистки, эпитопных меток, нацеливающих последовательностей, сигнальных пептидов, последовательностей транслокации через мембрану и модификаторов фармакокинетических свойств (PK).

Вариантом настоящего изобретения является терапевтическая композиция, где AARS полипептид по меньшей мере на 98 или 100% идентичен последовательности SEQ ID NO: 64 или 83.

Настоящее изобретение относится к изолированному полипептиду аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS), который является по меньшей мере на 90, 95, 98 или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO: 64 или 83 или ее фрагменту, который представляет собой 100 или более смежных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 64 или 83, причем имеет активность внеклеточной передачи сигнала, выбранную из модуляции высвобождения цитокинов, модуляции клеточной адгезии.

Вариантом настоящего изобретения является изолированный полипептид аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS), где AARS полипептид слит с гетерологичным полипептидом, выбранным из группы, состоящей из меток аффинной очистки, эпитопных меток, нацеливающих последовательностей, сигнальных пептидов, последовательностей транслокации через мембрану и модификаторов фармакокинетических свойств (PK).

Вариантом настоящего изобретения является изолированный полипептид аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS), где AARS полипептид по меньшей мере на 98 или 100% идентичен последовательности SEQ ID NO: 64 или 83.

Вариантом настоящего изобретения является изолированный полипептид аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS), где к указанному полипептиду ковалентно или нековалентно присоединен по меньшей мере один фрагмент, или где к указанному полипептиду ковалентно или нековалентно присоединен твердый субстрат, где по меньшей мере один фрагмент представляет собой детектируемую метку или растворимый в воде полимер.

Настоящее изобретение относится к клеточной композиции для рекомбинантной продукции вышеуказанного полипептида аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS), содержащая модифицированную популяцию клеток, в которой по меньшей мере одна клетка содержит и экспрессирует полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид AARS, и бессывороточную среду, причем указанные клетки способны расти в бессывороточной среде.

Настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему:

(i) нуклеотидную последовательность, которая кодирует вышеуказанный полипептид AARS.

Настоящее изобретение относится к способу идентификации соединения, которое специфично связывается с вышеуказанным полипептидом аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS), включающему:

а) объединение полипептида AARS по меньшей мере с одним исследуемым соединением в подходящих условиях связывания и

б) детектирование связывания полипептида AARS с исследуемым соединением, с идентификацией соединения, которое специфично связывается с полипептидом AARS.

Настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания путем введения вышеуказанного полипептида AARS.

Вариантом настоящего изобретения является способ лечения воспалительного заболевания, где воспалительным заболеванием является системный ювенильный артрит, системная красная волчанка, болезнь Крона и ревматоидный артрит.

Варианты реализации настоящего изобретения в целом относятся к открытию белковых фрагментов аминоксил-тРНК-синтетаз (AARS), которые обладают неканоническими видами биологической активности, такими как активность во внеклеточной передаче сигнала, и/или другими характеристиками терапевтического и диагностического значения. AARS являются универсальными и важными элементами системы синтеза белка, имеющейся во всех организмах, но AARS человека и связанные с ними белки имеют природные варианты, являющиеся результатом резекции, эффективно участвующие в клеточной передаче сигнала и принимающие участие в нормальном функционировании организма человека. Виды активности указанных белковых фрагментов отличаются от видов активности, связанных с синтезом белка, общеизвестных для AARS, и настоящее изобретение включает открытие и разработку указанных

резектированных белков как новых биотерапевтических агентов, новых реагентов для поисковых исследований и новых антигенов/мишеней для биологических препаратов направленного действия и диагностических агентов, которые можно применять для потенциального лечения или диагностики большого количества разнообразных заболеваний человека, таких как воспалительные, гематологические, нейродегенеративные, аутоиммунные, гематопозитические, сердечно-сосудистые и метаболические заболевания или нарушения.

Белковый фрагмент (фрагменты) AARS согласно настоящему изобретению, таким образом, может называться "резектином" или, в альтернативном варианте "аппендакрином". Как отмечено выше, термин "резектин" происходит от процесса вырезания, или резекции, конкретного белкового фрагмент AARS из последовательности соответствующей полноразмерной исходной AARS, в которой, как правило, его неканонические виды активности маскированы. В конкретных примерах с помощью указанного процесса резекции были идентифицированы белковые фрагменты и полинуклеотиды AARS согласно настоящему изобретению, как природные (например, протеолитические, сплайс-варианты), так и искусственные или предсказанные. Термин "аппендакрин" происходит от комбинации "аппенд" (от лат. *appender*) и "разделять" или "выявлять" (от греч. *сіnes*), и также отражает изолирование одного, или более, дополнительных доменов белковых фрагментов AARS из их соответствующей последовательности полноразмерного или исходного белка AARS.

Несмотря на то что ранее было показано, что некоторые фрагменты AARS обладают видами активности, не связанными с синтетазной функцией, экспрессия, изолирование, очистка и характеристика указанных фрагментов для биотерапевтического, научно-исследовательского или диагностического применения были ограничены, и для специалистов в данной области техники не является очевидным, что указанные активности связаны с каждым членом целого семейства AARS или с альтернативными фрагментами. В настоящем изобретении использовали методический подход для обнаружения и проверки белковых фрагментов AARS в 20 митохондриальных и 20 цитозольных AARS (и ассоциированных белках) для биотерапевтического применения, в целях поиска лекарственных средств и диагностического применения. Например, конкретный белковый фрагмент (фрагменты) AARS согласно настоящему изобретению и полинуклеотиды, которые его кодируют, идентифицированы в биологических образцах с использованием масс-спектрометрии (МС), главным образом для идентификации протеолитических фрагментов, и другие были идентифицированы с помощью методов глубокого секвенирования, главным образом в случае идентификации сплайс-вариантов. Другой белковый фрагмент (фрагменты) AARS идентифицирован с использованием предсказаний с помощью компьютерного моделирования аминокислотных последовательностей, например, с помощью компьютерного сравнения синтетаз человека и низших организмов, наряду с определением основных границ (например, сайтов протеазы); указанный подход использовали для анализа последовательности полноразмерного AARS на основе специфических критериев для изолирования протеолитических фрагментов и функциональных доменов, обладающих неканоническими видами биологической активности.

Новые резектины AARS являются неожиданными, и их дифференциальная экспрессия также является непредвиденной. Специфические резекции, как правило, наблюдаются при различных способах обработки (например, в клетках, культивируемых в среде, содержащей и не содержащей сыворотку), на различных стадиях роста (например, мозг взрослого по сравнению с мозгом эмбриона) и в различных типах тканей (например, поджелудочная железа по сравнению с печенью). Паттерн экспрессии не одинаков для всех аминоксил-тРНК-синтетаз, несмотря на то, что канонические функции для всех аминоксил-тРНК-синтетаз необходимы в одинаковых участках в клетке и на относительно пропорциональном уровне. Не следует ожидать повышения уровня активности аминоксил-тРНК-синтетазы без одновременного повышения уровня других видов активности аминоксил-тРНК-синтетазы. Данные масс-спектрометрии и глубокого секвенирования указывают на то, что резектины аминоксил-тРНК-синтетазы имеют различный уровень и встречаются в различных областях и на различных стадиях.

Кроме того, белковые фрагменты AARS могут быть экспрессированы и очищены до степени чистоты, достаточно высокой для распознавания их биологических свойств. Ранее фрагменты часто не соответствовали достаточной степени чистоты, укладки и стабильности для обеспечения возможности соответствующего биологического исследования несинтетазных видов активности. Клеточные анализы, например, используют в комбинации с достаточно чистыми, стабильными, растворимыми и правильно уложенными резектинами для выявления их функций, важных для биотерапевтического, научно-исследовательского или диагностического применения.

В частности, варианты реализации настоящего изобретения относятся к белковым фрагментам гистидил-тРНК-синтетазы, родственным агентам и композициям, имеющим биотерапевтическую, научно-исследовательскую или диагностическую применимость, и способам их применения. Композиции согласно настоящему изобретению применимы в различных диагностических целях, для разработки (поиска) лекарственных средств и в терапевтических целях, как описано в настоящем изобретении. Предпочтительно белки и фрагменты AARS очищают и хранят в подходящих условиях, если они требуются для указанного применения в биотерапевтических, научно-исследовательских или диагностических целях.

Конкретные варианты реализации изобретения включают композиции, содержащие изолированный

белковый фрагмент аминоксил-тРНК-синтетазы, состоящий по меньшей мере примерно из 100, 90, 80, 70, 60, 50 или 40 аминокислот, который содержит аминокислотную последовательность, описанную в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, и имеет растворимость, составляющую по меньшей мере примерно 5 мг/мл, причем чистота композиции составляет по меньшей мере примерно 95% по белку, и композиция содержит меньше примерно 10 единиц эндотоксина (ЕЭ) на мг белка. Согласно одному аспекту композиция представляет собой терапевтическую композицию. Согласно конкретному варианту реализации изобретения композиция по существу не содержит сыворотки. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения белковый фрагмент AARS обладает неканонической активностью. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения неканоническая биологическая активность выбрана из модуляции внеклеточной передачи сигнала, модуляции пролиферации клеток, модуляции дифференцировки клеток, модуляции транскрипции генов, модуляции продукции или активности цитокинов, модуляции активности цитокиновых рецепторов и модуляции воспаления. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения EC_{50} белкового фрагмента AARS составляет меньше примерно 1 нМ, примерно 5 нМ, примерно 10 нМ, примерно 50 нМ, примерно 100 нМ или примерно 200 нМ для клеточной неканонической биологической активности.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения белковый фрагмент AARS слит с гетерологичным полипептидом. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения слитый белок AARS по существу сохраняет неканоническую активность белкового фрагмента AARS. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения слитый белок AARS подавляет неканоническую активность белкового фрагмента AARS. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения гетерологичный полипептид присоединен к N-концу белкового фрагмента AARS. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения гетерологичный полипептид присоединен к C-концу белкового фрагмента AARS. Согласно одному аспекту любого из указанных вариантов реализации изобретения гетерологичный полипептид выбран из группы, состоящей из меток очистки, эпитопных меток, нацеливающих последовательностей, сигнальных пептидов, последовательностей транслокации через мембрану и модификаторов фармакокинетики свойств (PK).

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения композиция содержит белковый фрагмент AARS в концентрации, составляющей по меньшей мере примерно 10 мг/мл. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения композиция содержит белковый фрагмент AARS, который является по меньшей мере на 90% монодисперсным. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения композиция содержит меньше примерно 3% высокомолекулярных агрегированных белков. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения композиция характеризуется менее чем 3% агрегацией при хранении в концентрации, составляющей по меньшей мере 10 мг/мл, в ФСБ в течение одной недели при 4°C. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения композиция характеризуется менее чем 3% агрегацией при хранении в концентрации, составляющей по меньшей мере 10 мг/мл, в ФСБ в течение одной недели при комнатной температуре.

Различные анализы для измерения указанных признаков резектинов описаны в настоящем изобретении и могут быть применены для определения аспектов изобретения. Согласно конкретным аспектам изобретения, указанные признаки являются предпочтительными для биотерапевтического применения белковых фрагментов AARS, описанных в настоящем изобретении.

Конкретные варианты реализации изобретения включают композиции, содержащие изолированный белковый фрагмент аминоксил-тРНК-синтетазы, состоящий по меньшей мере из 60 аминокислот, который отличается от аминокислотной последовательности, описанной в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9 заменой, делецией и/или добавлением примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот, причем измененный белковый фрагмент по существу сохраняет неканоническую активность неизмененного белка или имеет доминантный отрицательный фенотип в отношении неканонической активности, где растворимость указанного белкового фрагмента составляет по меньшей мере примерно 5 мг/мл, и где чистота композиции составляет по меньшей мере примерно 95% (на основе белка) и указанная композиция содержит меньше примерно 10 ЕЭ/мг белка эндотоксина. Согласно конкретному варианту реализации изобретения композиция по существу не содержит сыворотки.

Другие варианты реализации изобретения включают композиции, содержащие изолированное антитело, которое специфично связывается с изолированным белковым фрагментом аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS), описанным в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, где аффинность указанного антитела к указанному белковому фрагменту AARS примерно в 10 раз превышает его аффинность к соответствующему полноразмерному полипептиду AARS. Один из неожиданных аспектов настоящего изобретения включает конкретные резектины, обладающие "новыми" поверхностями, доступными для антитела или других нацеленных биологических агентов, тогда как в полноразмерном белке AARS указанные поверхности "спрятаны" или закрыты другими последовательностями или соседними доменами. Процесс резекции также может приводить к получению большей доступности для воды, благодаря чему проявляются ранее не идентифицированные виды биологической активности. Некоторые варианты реализации изобретения включают композиции, содержащие изолированное антитело, которое специфично связывается с изолированным белковым фрагментом аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS), описанным в табл. 1-3, или 4-6,

или 7-9, где аффинность антитела к белковому фрагменту AARS составляет по меньшей мере примерно 10 нМ, и аффинность к соответствующему полноразмерному полипептиду AARS составляет по меньшей мере примерно 100 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения антитело связывается с эпитопом, расположенным в уникальной границе сплайсинга полипептида AARS, описанной в любой таблице (любых таблицах) из табл. 1-3, 4-6 и 7-9, или с аминокислотной последовательностью С-конца указанного сайта сплайсинга. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения антитело проявляет антагонизм в отношении неканонической активности белкового фрагмента AARS. Указанные антагонисты могут необязательно связываться с соответствующей исходной или полноразмерной AARS.

Другие аспекты относятся к системам биоанализа, содержащим по существу чистый белковый фрагмент аминоксил-тРНК-синтетазы, состоящий по меньшей мере из 60 аминокислот, который содержит аминокислотную последовательность, приведенную в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, и партнер по связыванию, который связывается с указанным белковым фрагментом AARS. Согласно одному аспекту, партнер по связыванию выбран из группы, состоящей из белка-рецептора клеточной поверхности, нуклеиновой кислоты, липидной мембраны, клеточного регуляторного белка, фермента и фактора транскрипции. Необязательно, указанный рецептор может являться частью клетки, предпочтительно клетки, подходящей для выявления биологической активности резектина.

Конкретные варианты реализации изобретения включают клеточные композиции, содержащие изолированный белковый фрагмент аминоксил-тРНК-синтетазы, состоящий по меньшей мере из 60 аминокислот, который содержит аминокислотную последовательность, описанную в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, и модифицированную популяцию клеток, в которых по меньшей мере одна клетка содержит полинуклеотид, кодирующий указанный белковый фрагмент AARS. Согласно одному аспекту, указанные клетки способны расти в бессывороточной среде.

Также предложены системы выявления, содержащие по существу чистый белковый фрагмент аминоксил-тРНК-синтетазы, состоящий по меньшей мере из 50 или 100 аминокислот, который содержит аминокислотную последовательность, описанную в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, клетку, которая содержит рецептор клеточной поверхности или его внеклеточную часть, которая связывается с белковым фрагментом, и молекулу, размер которой составляет меньше примерно 2000 дальтон, или второй полипептид, который модулирует связывание или взаимодействие между указанным белковым фрагментом AARS и указанным внеклеточным рецептором.

Конкретные варианты реализации включают диагностические системы, содержащие по существу чистый белковый фрагмент аминоксил-тРНК-синтетазы, состоящий по меньшей мере из 60 аминокислот, который содержит аминокислотную последовательность, описанную в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, и клетку, которая содержит рецептор клеточной поверхности или его внеклеточную часть, которая связывается с белковым фрагментом AARS, где указанная система или клетка содержит индикаторную молекулу, которая позволяет детектирование изменения уровня или активности указанного рецептора клеточной поверхности или его внеклеточной части.

Конкретные варианты реализации изобретения включают устройства для выращивания клеток, содержащие изолированный белковый фрагмент аминоксил-тРНК-синтетазы, состоящий по меньшей мере из 60 аминокислот, который содержит аминокислотную последовательность, описанную в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, модифицированную популяцию клеток, в которой по меньшей мере одна клетка содержит полинуклеотид, кодирующий указанный белковый фрагмент AARS, по меньшей мере примерно 10 л бессывороточной среды для культивирования клеток и стерильный контейнер. Согласно конкретному варианту реализации изобретения клетки, используемые в любом из способов или композиций, описанных в настоящем изобретении, способны расти в бессывороточной среде, необязательно в присутствии антибиотика и индуктора.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к антисмысловым агентам или агентам РНК-интерференции (РНКи), содержащим последовательность, нацеленную против уникальной границы сплайсинга сплайс-варианта AARS, представленного в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9.

Также предложены терапевтические композиции, содержащие изолированный белковый фрагмент аминоксил-тРНК-синтетазы, состоящий по меньшей мере из 60 аминокислот, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, где указанный белковый фрагмент специфично связывается с партнером по связыванию и имеет растворимость, составляющую по меньшей мере примерно 5 мг/мл, и при этом чистота указанной композиции составляет по меньшей мере примерно 95% по белку. Согласно некоторым аспектам, композиция может содержать менее чем 10 ЕЭ эндотоксина/мг белка.

Также предложены композиции, содержащие изолированный белковый фрагмент аминоксил-тРНК-синтетазы, состоящий по меньшей мере из 60 аминокислот, который является по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98 или 100% идентичным аминокислотной последовательности, приведенной в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, причем растворимость указанного белкового фрагмента составляет по меньшей мере примерно 5 мг/мл, и при этом чистота указанной композиции составляет по меньшей мере примерно 95% (на основе белка), и указанная композиция содержит менее чем 10 ЕЭ эндотоксина/мг белка. Согласно любому из указанных вариантов реализации изобретения композиции могут содержать белковый фрагмент AARS,

который является по меньшей мере примерно на 50%, примерно на 60%, примерно на 70%, примерно на 80%, примерно на 90% или примерно на 95% монодисперсным с точки зрения его определенной молекулярной массы. Согласно другому аспекту любого из указанных вариантов реализации изобретения композиции содержат меньше примерно 10% (на основе белка) высокомолекулярных агрегированных белков, или меньше примерно 5% высокомолекулярных агрегированных белков, или меньше примерно 4% высокомолекулярных агрегированных белков, или меньше примерно 3% высокомолекулярных агрегированных белков, или менее чем 2% высокомолекулярных агрегированных белков, или меньше примерно 1% высокомолекулярных агрегированных белков.

Согласно другому аспекту любого из указанных вариантов реализации изобретения композиция демонстрирует менее чем 10% агрегацию при хранении в концентрации, составляющей по меньшей мере 10 мг/мл, в ФСБ в течение одной недели при 4°C, или демонстрирует менее чем 5% агрегацию при хранении в концентрации, составляющей по меньшей мере 10 мг/мл, в ФСБ в течение одной недели при 4°C, или характеризуется менее чем 3% агрегацией при хранении в концентрации, составляющей по меньшей мере 10 мг/мл, в ФСБ в течение одной недели при 4°C, или агрегирует меньше примерно на 2% при хранении в концентрации, составляющей по меньшей мере 10 мг/мл, в ФСБ в течение одной недели при 4°C, или характеризуется менее чем 1% агрегацией при хранении в концентрации, составляющей по меньшей мере 10 мг/мл, в ФСБ в течение одной недели при 4°C.

Конкретные варианты реализации изобретения включают композиции, содержащие по существу чистый белковый фрагмент аминоксил-тРНК-синтетазы, состоящий по меньшей мере из 60 аминокислот, который содержит аминокислотную последовательность, описанную в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9 и по меньшей мере один ковалентно или не ковалентно присоединенный к нему агент. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения указанный агент представляет собой детектируемую метку. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения указанный фрагмент представляет собой растворимый в воде полимер. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения указанный агент представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ). Согласно одному аспекту любого из указанных вариантов реализации изобретения указанный фрагмент присоединен к N-концу белкового фрагмента. Согласно одному аспекту любого из указанных вариантов реализации изобретения указанный агент присоединен к C-концу белкового фрагмента.

Конкретные варианты реализации включают композиции, содержащие твердый субстрат, присоединенный к изолированному белковому фрагменту аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS), состоящему по меньшей мере из 60 аминокислот, который содержит аминокислотную последовательность, приведенную в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, или его биологически активному фрагменту или варианту, причем растворимость указанного белкового фрагмента составляет по меньшей мере примерно 5 мг/мл, и при этом чистота композиции составляет по меньшей мере примерно 95% по белку.

Также предложены композиции, содержащие связывающий агент, который специфично связывается с изолированным белковым фрагментом аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS), приведенным в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, причем аффинность указанного связывающего агента к указанному белковому фрагменту составляет по меньшей мере примерно 1 нМ. Согласно одному аспекту, связывающий агент связывается с эпитопом, расположенным в уникальной границе сплайсинга полипептида AARS, приведенной в любой таблице (любых таблицах) из табл. 1-3, 4-6 и 7-9, или с C-концом аминокислотной последовательности указанного сайта сплайсинга. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения связывающий агент проявляет антагонизм в отношении неканонической активности полипептида AARS.

Конкретные варианты реализации изобретения включают изолированный полипептид аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS), содержащий аминокислотную последовательность белкового фрагмента AARS, описанного в настоящем изобретении, аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом AARS, описанным в настоящем изобретении, или его вариант или фрагмент. Конкретные полипептиды AARS включают аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98 или 100% идентичной эталонной последовательности AARS, приведенной в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, или табл. E2. Конкретные полипептиды AARS по существу состоят из аминокислотной последовательности, которая является по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98 или 100% идентичной эталонной последовательности AARS, приведенной в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, или табл. E2. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения указанный полипептид обладает неканонической биологической активностью. Согласно конкретному варианту реализации изобретения указанная неканоническая биологическая активность выбрана из модуляции клеточной передачи сигнала (например, внеклеточной передачи сигнала), модуляции пролиферации клеток, модуляции миграции клеток, модуляции дифференцировки клеток, модуляции апоптоза или клеточной гибели, модуляции ангиогенеза, модуляции клеточного связывания, модуляции клеточного метаболизма, модуляции клеточного поглощения, модуляции транскрипции генов или секреции, модуляции продукции или активности цитокинов, модуляции активности цитокиновых рецепторов и модуляции воспаления.

Другие аспекты включают антитела и другие связывающие агенты, которые проявляют специфичность связывания в отношении изолированного полипептида AARS, описанного в настоящем изобретении, партнера по связыванию полипептида AARS, или их комплекса. Согласно некоторым вариантам

реализации изобретения аффинность антитела или связывающего агента к полипептиду AARS примерно в 10 раз превышает его аффинность к соответствующему полноразмерному полипептиду AARS. Согласно конкретному варианту реализации изобретения связывающий агент выбран из пептида, пептидомиметика, аднектина, аптамера и низкомолекулярного соединения. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения антитело или связывающий агент проявляет антагонизм в отношении неканонической активности полипептида AARS. Согласно другим вариантам реализации изобретения антитело или связывающий агент проявляет агонизм в отношении неканонической активности полипептида AARS.

Конкретные варианты реализации изобретения включают изолированные полинуклеотиды аминоксил-тРНК-синтазы (AARS), содержащие нуклеотидную последовательность полинуклеотида AARS, описанную в настоящем изобретении, нуклеотидную последовательность, кодирующую белковый фрагмент AARS, описанный в настоящем изобретении, или его вариант, фрагмент или соответствующий комплементарный полинуклеотид. Конкретные полинуклеотиды AARS содержат нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98 или 100% идентичной эталонной последовательности полинуклеотида AARS или соответствующей комплементарной последовательности, приведенной в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, или табл. E2. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения нуклеотидная последовательность является кодон-оптимизированной для бактериальной экспрессии. Согласно одному аспекту, нуклеотидная последовательность является по меньшей мере на 80% идентичной полинуклеотидной последовательности, описанной в табл. E2.

Конкретные полинуклеотиды AARS состоят по существу из нуклеотидной последовательности, которая является по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98 или 100% идентичной эталонной последовательности полинуклеотида AARS или его комплемента, приведенной в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, или табл. E2. Другие полинуклеотиды AARS содержат или по существу состоят из нуклеотидной последовательности, которая специфично гибридизуется с эталонным полинуклеотидом AARS, приведенным в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, или табл. E2. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения указанный полинуклеотид выбран из праймера, зонда и антисмыслового олигонуклеотида. Согласно конкретному варианту реализации изобретения указанный праймер, зонд или антисмысловый олигонуклеотид нацелен против специфической или уникальной границы сплайсинга и/или последовательности, расположенной в 3'-направлении от указанного сайта сплайсинга указанного полинуклеотида AARS.

Конкретные варианты реализации изобретения включают способы определения присутствия или уровня белкового фрагмента AARS в образце, включающие осуществление контакта образца с одним или более связывающими агентами, которые специфично связываются с белковым фрагментом AARS, описанным в настоящем изобретении, детектирование присутствия или отсутствия указанного связывающего агента, что обеспечивает возможность определения или уровня белкового фрагмента AARS. Другие варианты реализации изобретения включают способы определения присутствия или уровня белкового фрагмента AARS в образце, включающие анализ образца с помощью детектора, способного специфично идентифицировать указанный белковый фрагмент, описанный в настоящем изобретении, обеспечивая, таким образом, определение присутствия или уровня белкового фрагмента AARS. Согласно конкретному варианту реализации изобретения детектор представляет собой масс-спектрометр (МС), проточный цитометр, устройство визуализации белка, тест-системы для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или белковый микрочип. Конкретные варианты реализации изобретения включают сравнение присутствия или уровня белкового фрагмента AARS с контрольным образцом или заранее определенным значением. Конкретные варианты реализации изобретения включают исследование состояния образца для различения его от контроля. Согласно конкретному варианту реализации изобретения образец и контроль включают клетку или ткань, и способ включает осуществление различения клеток или тканей различных видов, клеток различных тканей или органов, клеток на различных стадиях клеточного развития, клеток на различных стадиях дифференцировки клеток, клеток в различных физиологических состояниях или между здоровыми и больными клетками. Например, выбранные резектины могут являться более многочисленными при таких состояниях, как стресс или инсульт.

Конкретные варианты реализации изобретения включают разработку способов и соответствующих композиций для идентификации соединения, которое специфично связывается с полипептидом аминоксил-тРНК-синтазы (AARS), описанным в настоящем изобретении, или одним, или более, из его клеточных партнеров по связыванию, включающих а) объединение полипептида AARS или его клеточного партнера по связыванию, или обоих по меньшей мере с одним исследуемым соединением в подходящих условиях и б) детектирование связывания полипептида AARS или его клеточного партнера по связыванию, или обоих, с указанным исследуемым соединением, что обеспечивает идентификацию соединения, которое специфично связывается с полипептидом AARS или его клеточным партнером по связыванию, или обоими. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения исследуемое соединение представляет собой полипептид или пептид, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пептидомиметик или низкомолекулярное соединение. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения исследуемое соединение является агонистом неканонической биологической активности полипептида AARS или его клеточного партнера по связыванию. Согласно другим вариантам реализации изобретения исследуемое соединение проявляет антагонизм в отношении неканонической биологической активности

полипептида AARS или его клеточного партнера по связыванию. Конкретные варианты реализации изобретения включают соединение, идентифицированное с помощью указанного выше способа, такое как агонист (например, низкомолекулярное соединение, пептид).

Конкретные варианты реализации изобретения включают способы определения присутствия или уровня полинуклеотидной последовательности сплайс-варианта AARS в образце, включающие осуществление контакта образца с одним или более олигонуклеотидами, которые специфично гибридизуются с полинуклеотидом AARS, описанным в настоящем изобретении, детектирование присутствия или отсутствия указанных олигонуклеотидов в образце и что обеспечивает возможность определения присутствия или уровня полинуклеотидной последовательности сплайс-варианта AARS. Другие варианты реализации изобретения включают способы определения присутствия или уровня полинуклеотидной последовательности сплайс-варианта AARS в образце, включающие осуществление контакта образца по меньшей мере с двумя олигонуклеотидами, которые специфично амплифицируют полинуклеотид AARS, описанный в настоящем изобретении, проведение реакции амплификации, детектирование присутствия или отсутствия амплифицированного продукта, что обеспечивает возможность определения присутствия или уровня полинуклеотидной последовательности сплайс-варианта AARS. Согласно конкретному варианту реализации изобретения олигонуклеотид (олигонуклеотиды) специфично гибридизуется или специфично амплифицирует границу сплайсинга, которая является уникальной для сплайс-варианта AARS. Конкретные варианты реализации изобретения включают сравнение присутствия или уровня белкового фрагмента или сплайс-варианта AARS с контрольным образцом или заранее определенным значением. Конкретные варианты реализации изобретения включают исследование состояния образца для его отличия от контроля. Согласно конкретному варианту реализации изобретения указанный образец и контроль включают клетку или ткань, и указанный способ включает осуществление различия клеток или тканей различных видов, клеток различных тканей или органов, клеток на различных стадиях клеточного развития, клеток на различных стадиях дифференцировки клеток или здоровых и больных клеток.

Некоторые варианты реализации изобретения включают фармацевтические композиции, содержащие полинуклеотид AARS, описанный в настоящем изобретении, полипептид AARS, описанный в настоящем изобретении, связывающий агент, описанный в настоящем изобретении, или соединение, идентифицированное с помощью указанного выше способа или описанное в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый наполнитель или носитель.

Конкретные варианты реализации изобретения включают способы модуляции клеточной активности клетки, включающие осуществление контакта указанной клетки с полинуклеотидом AARS, описанным в настоящем изобретении, полипептидом AARS, описанным в настоящем изобретении, связывающим агентом, описанным в настоящем изобретении, соединением, полученным согласно указанному выше способу или описанным в настоящем изобретении, или фармацевтической композицией, описанной в настоящем изобретении. Согласно конкретному варианту реализации изобретения клеточная активность выбрана из пролиферации клеток, миграции клеток, дифференцировки клеток, апоптоза или клеточной гибели, клеточной передачи сигнала, ангиогенеза, клеточного связывания, клеточного поглощения, клеточной секреции, метаболизма, продукции или активности цитокинов, активности цитокиновых рецепторов, транскрипции генов и воспаления. Согласно одному аспекту, клетка выбрана из группы, состоящей из преадипоцитов, клеток костного мозга, нейтрофилов, клеток крови, гепатоцитов, астроцитов, мезенхимальных стволовых клеток и клеток скелетной мускулатуры.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения клетка находится в теле субъекта. Конкретные варианты реализации изобретения включают лечение субъекта, где указанный субъект страдает состоянием, связанным с неопластическим заболеванием, заболеванием или состоянием иммунной системы, инфекционным заболеванием, метаболическим заболеванием, воспалительным нарушением, нервным/неврологическим заболеванием, мышечным/сердечно-сосудистым заболеванием, заболеванием, связанным с нарушением кроветворения, заболеванием, связанным с нарушением ангиогенеза, или заболеванием, связанным с нарушением выживаемости клеток.

Также предложены способы получения фармацевтического соединения, включающие: а) проведение скрининга *in vitro* одного или более кандидатов соединения в присутствии белкового фрагмента AARS, состоящего по меньшей мере из 60 аминокислот, который содержит аминокислотную последовательность, описанную в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, с идентификацией соединения, которое специфично связывается с белковым фрагментом AARS; б) проведение клеточного или биохимического или рецепторного анализа соединения, идентифицированного на этапе а), с идентификацией соединения, которое модулирует один или более видов неканонической активности белкового фрагмента AARS; в) необязательно оценку зависимости активности от структуры (structure-activity relationship, SAR) соединения, идентифицированного на этапе б), с соотношением его структуры со способностью к модуляции неканонической активности, и, необязательно, дериватизацию соединения с изменением его способности модулировать неканоническую активность; и d) производство достаточного количества соединения, идентифицированного на этапе б) или дериватизация соединения, полученного на этапе в), для применения у людей, таким образом, для изготовления фармацевтического соединения.

Другие варианты реализации изобретения включают способы получения фармацевтического соеди-

нения, включающие: а) проведение скрининга *in vitro* одного или более кандидатов соединения в присутствии рецептора клеточной поверхности или его внеклеточной части, которая специфично связывается с белковым фрагментом AARS, описанным в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, с идентификацией соединения, которое специфично связывается с рецептором клеточной поверхности или его внеклеточной частью; б) проведение клеточного или биохимического или рецепторного анализа с соединением, идентифицированным на этапе а), с идентификацией соединения, которое модулирует один или более видов неканонической активности белкового фрагмента AARS; с) необязательно оценку зависимости активности от структуры (SAR) соединения, идентифицированного на этапе б), с соотношением его структуры с модулирующей неканонической активности, и, необязательно, дериватизацию соединения с изменением его способности модулировать указанную неканоническую активность; и d) производство достаточного количества соединения, идентифицированного на этапе б) или дериватизированного соединения, полученного на этапе с), для применения у людей, таким образом, для изготовления фармацевтического соединения.

Некоторые варианты реализации изобретения включают клеточную композицию, содержащую модифицированную популяцию клеток, в которой по меньшей мере одна клетка содержит полинуклеотид, кодирующий гетерологичный полноразмерный белок аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS), где указанные клетки способны расти в бессывороточной среде. Согласно одному аспекту, полноразмерный белок аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS) содержит гетерологичную метку очистки или эпитопную метку, обеспечивающую облегчение очистки белкового фрагмента AARS. Согласно другому аспекту, полноразмерный белок аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS) содержит гетерологичный сайт протеолиза, обеспечивающий продукцию белкового фрагмента AARS при расщеплении.

Некоторые варианты реализации изобретения включают способ получения полипептида AARS, приведенного в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, или табл. E2, *in situ* в клетке, включающий: i) экспрессию гетерологичного полноразмерного белка аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS) в клетке, причем указанная клетка содержит протеазу, способную расщеплять указанный гетерологичный полноразмерный белок аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS) с получением полипептида AARS.

Некоторые варианты реализации изобретения включают способ продукции полипептида AARS, приведенного в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, или табл. E2, включающий осуществление контакта изолированного полноразмерного белка аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS) с протеазой, которая способна расщеплять полноразмерный белок аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS), и продукцию полипептида AARS.

Некоторые варианты реализации изобретения включают модифицированный полноразмерный белок аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS), содержащий гетерологичный сайт протеолиза для обеспечения протеолитической генерации белкового фрагмента AARS, приведенного в любой таблице (любых таблицах) из табл. 1-3, 4-6 и 7-9 или табл. E2.

Некоторые варианты реализации изобретения включают композицию, содержащую изолированный полноразмерный белок аминоксил-тРНК-синтетазы, причем чистота указанной композиции составляет по меньшей мере примерно 95% (на основе белка), и указанная композиция содержит меньше примерно 10 ЕЭ эндотоксина/мг белка и по существу не содержит сыворотки. Согласно одному аспекту, полноразмерный белок аминоксил-тРНК-синтетазы присутствует в концентрации, составляющей по меньшей мере 10 мг/мл и является по меньшей мере на 90% монодисперсным. Другой вариант реализации изобретения включает способ лечения заболевания или нарушения, опосредованного нарушенной регуляцией экспрессии, активности или пространственно-временного расположения тРНК-синтетазы, посредством введения белкового фрагмента AARS или нуклеиновой кислоты, кодирующей белковый фрагмент AARS, приведенный в любой таблице (любых таблицах) из табл. 1-3, 4-6 и 7-9 или E2. Согласно одному аспекту настоящего изобретения, заболевание выбрано из группы, состоящей из рака, нейропатии, диабета и воспалительных нарушений.

Подробное описание изобретения

I. Введение.

Настоящее изобретение относится, по меньшей мере, отчасти к поиску новых полипептидов AARS и способов их получения и применения, которые включают трансформацию нативных белков дикого типа в новые формы, которые проявляют значительно отличающиеся характеристики по сравнению с природными генами полноразмерной гистидил-тРНК-синтетазы. Указанные полипептиды AARS были идентифицированы на основе глубокого анализа последовательности и масс-спектрометрического анализа экспрессированной гистидил-тРНК-синтетазы в различных тканях, с последующей системной продукцией и тестированием каждого потенциального полипептида AARS для идентификации белковой последовательности, которая предоставляет стабильные и растворимые белковые домены, проявляющие новые биологические активности и благоприятные терапевтические характеристики для лекарственного средства.

На основе указанного анализа был идентифицирован ряд новых семейств полипептидов AARS, полученных из гистидил-тРНК-синтетазы.

Согласно первому аспекту, указанные производные от гистидил-тРНК-синтетазы полипептиды AARS включают полипептидные последовательности, содержащие приблизительно 1-141, 1-408, 1-113, 1-244+26 aa, 191-333, 405-509, (1-60+175-509), (1-100+211-509), (1-60+101-509), (1-100+175-509), (1-

60+399-509), (1-100+399-509) или 369-509 аминокислот гистидил-тРНК-синтетазы. Указанные новые семейства полипептидов AARS представляют собой новые, ранее неизвестные белковые продукты, которые проявляют, среди прочего, i) новую биологическую активность, ii) благоприятные характеристики стабильности и агрегации белка и iii) способность экспрессироваться и продуцироваться на высоком уровне в прокариотических системах экспрессии, которые являются по существу отличающимися характеристиками, не обнаруживаемыми в интактных белках дикого типа.

II. Определения.

Если иное не указано, все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют такое же значение, как и общепринятое значение для специалистов в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящем изобретении, могут применяться для практического осуществления или проверки настоящего изобретения, описаны предпочтительные способы и материалы. В целях настоящего изобретения, следующие термины определены ниже.

Употребление существительного в единственном числе в настоящем изобретении относится к одному или более чем одному (т.е. по меньшей мере одному) указанному существительному. В качестве примера, "элемент" означает один элемент или более одного элемента.

Термин "примерно" подразумевает количество, уровень, значение, число, частоту, процент, расстояние, размер, содержание, массу или длину, которая варьирует не более чем на 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% по сравнению с указанным количеством, уровнем, значением, числом, частотой, процентом, расстоянием, размером, содержанием, массой или длиной.

Термин "агонист" относится к молекуле, которая усиливает или имитирует активность. Например, неканоническую биологическую активность AARS или другого белка. Агонисты могут включать белки, нуклеиновые кислоты, углеводороды, низкомолекулярные соединения или любое другое соединение или композицию, которая модулирует активность AARS либо путем непосредственного взаимодействия с AARS или его партнером по связыванию, либо путем действия на компоненты биологического пути, в котором AARS принимает участие. Включены частичные и полные агонисты.

В настоящем изобретении термин "аминокислота" означает как природные, так и неприродные аминокислоты, также как и аминокислотные аналоги и миметики. Природные аминокислоты включают 20 (L)-аминокислот, которые используются в ходе биосинтеза белка, также как и другие, такие как 4-гидроксипролин, гидроксизин, десмозин, изодесмозин, гомоцистеин, цитруллин и орнитин, например. Неприродные аминокислоты включают, например, (D)-аминокислоты, норлейцин, норвалин, п-фторфенилаланин, этионин и т.п., которые известны специалистам в данной области техники. Аминокислотные аналоги включают модифицированные формы природных и неприродных аминокислот. Указанные модификации могут включать, например, замену или замещение химических групп и фрагментов аминокислот или дериватизацию аминокислот. Аминокислотные миметики включают, например, органические структуры, которые обладают функционально сходными свойствами, такие как заряд и расстояние между зарядами эталонной аминокислоты. Например, органическая структура, которая имитирует аргинин (Arg или R), имеет положительно заряженный фрагмент, расположенный в таком же молекулярном пространстве и имеющий такую же степень подвижности, как е-амино группа боковой цепи природных Arg аминокислот. Миметики также включают неестественные структуры, созданные для поддержания оптимального расстояния и взаимодействия между зарядами аминокислоты или функциональных групп аминокислоты. Специалисты в данной области техники знают или могут определить, какие структуры составляют функционально эквивалентные аналоги и миметики аминокислот.

Согласно конкретным аспектам изобретения применение неприродных аминокислот может использоваться для модификации (например, повышения) выбранной неканонической активности белкового фрагмента AARS или для изменения *in vivo* или *in vitro* периода полувыведения белка. Неприродные аминокислоты также можно применять для облегчения (селективного) химических модификаций (например, пэгилирования) белка AARS. Например, конкретные неприродные аминокислоты позволяют селективное присоединение полимеров, таких как полиэтиленгликоль, ПЭГ, к данному белку и, таким образом, улучшают их фармакокинетические свойства.

Конкретные примеры аминокислотных аналогов и миметиков могут быть найдены, например, в источниках Roberts and Vellaccio, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Eds. Gross and Meinhofer, Vol. 5, p. 341, Academic Press, Inc., New York, N.Y. (1983), которые полностью включены в настоящее изобретение посредством ссылки. Другие примеры включают пералкилированные аминокислоты, в частности, перметилированные аминокислоты. См., например, *Combinatorial Chemistry*, Eds. Wilson and Czarnik, Ch. 11, p. 235, John Wiley & Sons Inc., New York, N.Y. (1997), полностью включенный в настоящее изобретение посредством ссылки. Другие примеры включают аминокислоты, амидная часть которых (и, следовательно, амидный каркас полученного в результате пептида) замещена, например, на сахарное кольцо, стероид, бензодиазепин или карбоцикл. См., например, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, Ed. Manfred E. Wolff, Ch. 15, p. 619-620, John Wiley & Sons Inc., New York, N.Y. (1995), которые полностью включены в настоящее изобретение посредством ссылки. Способы синтеза пептидов, полипептидов, пептидомиметиков и белков хорошо известны в данной области техники (см., например, патент

США № 5420109; M. Bodanzsky, Principles of Peptide Synthesis (1st ed. & 2d rev. ed.), Springer-Verlag, New York, N.Y. (1984 & 1993), см. Главу 7; Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, (2d ed.), Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984), каждый из которых включен в настоящее изобретение посредством ссылки). Соответственно, полипептиды AARS согласно настоящему изобретению могут состоять из природных и неприродных аминокислот, также как и аминокислотных аналогов и миметиков.

Термин "антагонист" относится к молекуле, которая снижает или ослабляет активность. Например, неканоническую биологическую активность AARS или другого белка. Антагонисты могут включать белки, такие как антитела, нуклеиновые кислоты, углеводороды, низкомолекулярные соединения или любое другое соединение или композицию, которая модулирует активность AARS или его партнера по связыванию, либо путем непосредственного взаимодействия AARS или его партнера по связыванию, либо путем действия на компоненты биологического пути, в котором AARS принимает участие. Включены частичные и полные антагонисты.

Термин "аминоацил-тРНК-синтаза" (AARS) в целом относится к ферментам, которые в своей природной форме или форме дикого типа способны катализировать сложную этерификацию конкретной аминокислоты или ее предшественника с одной из всех совместимых с ней узнаваемых молекул тРНК с образованием аминоацил-тРНК. В соответствии с указанной "традиционной" активностью, аминоацил-тРНК-синтаза катализируют двухэтапную реакцию: во-первых, они активируют соответствующие аминокислоты путем образования аминоациладенилата, в котором карбоксил аминокислоты связывается с альфа-фосфатом АТФ путем замещения пирофосфата, и затем, когда связывается правильная тРНК, аминоацильная группа аминоациладенилата превращается в 2'- или 3'-концевой ОН тРНК.

Аминоацил-тРНК-синтазы I класса, как правило, содержат два мотива с высоко консервативными последовательностями. Указанные ферменты аминоацилируют аденозиновый нуклеотид в положении 2'-ОН и обычно являются мономерными или димерными. Аминоацил-тРНК-синтазы II класса, как правило, содержат три мотива с высоко консервативными последовательностями. Указанные ферменты аминоацилируют тот же аденозин в положении 3'-ОН и обычно являются димерными или тетрамерными. Активные сайты ферментов II класса в основном состоят из β -листа, состоящего из семи антипараллельных цепей, фланкируемого α -спиралями. Несмотря на то что фенилаланин-тРНК-синтаза относится ко II классу, она производит аминоацилирование в положении 2'-ОН.

Полипептиды AARS включают источники митохондриальных и цитоплазматических форм тирозил-тРНК-синтаз (TyrRS), триптофанил-тРНК-синтаз (TrpRS), а глутаминил-тРНК-синтаз (GlnRS), глицил-тРНК-синтаз (GlyRS), гистидил-тРНК-синтаз (HisRS), серил-тРНК-синтаз (SerRS), фенилаланил-тРНК-синтаз (PheRS), аланил-тРНК-синтаз (AlaRS), аспарагинил-тРНК-синтаз (AsnRS), гистидил-тРНК-синтаз (AspRS), цистеинил-тРНК-синтаз (CysRS), глутамил-тРНК-синтаз (GluRS), пролил-тРНК-синтаз (ProRS), аргинил-тРНК-синтаз (ArgRS), изолейцил-тРНК-синтаз (IleRS), лейцил-тРНК-синтаз (LeuRS), лизил-тРНК-синтаз (LysRS), треонил-тРНК-синтаз (ThrRS), метионил-тРНК-синтаз (MetRS) или валил-тРНК-синтаз (ValRS). Последовательности дикого типа или исходные последовательности указанных полипептидов AARS известны в данной области техники.

"Кодирующая последовательность" означает любую последовательность нуклеиновых кислот, которая участвует в кодировании полипептидного продукта гена. Термин "некодирующая последовательность", наоборот, относится к любой последовательности нуклеиновых кислот, которая не участвует в кодировании полипептидного продукта гена.

В тексте настоящего изобретения, если иное не вытекает из контекста, следует понимать, что слова "включает", "содержит" и "содержащий" подразумевают включение приведенного этапа или элемента, или группы этапов или элементов, но не исключение любых других этапов или элементов, или групп этапов или элементов.

"Состоящий из" означает включение и ограничение теми элементами, которые следуют за фразой "состоящий из". Таким образом, фраза "состоящий из" указывает на то, что перечисленные элементы необходимы или являются обязательными, и что другие элементы не могут присутствовать. "Состоящий по существу из" означает включение любых элементов, перечисленных после указанной фразы, и ограничение другими элементами, которые не препятствуют или не вносят вклад в активность или действие, заявленное в настоящем изобретении для перечисленных элементов. Таким образом, фраза "по существу состоящий из" указывает на то, что перечисленные элементы необходимы или являются обязательными, но что другие элементы являются необязательными и могут присутствовать или не присутствовать в зависимости от того, влияют ли они значительно на активность или действие перечисленных элементов.

Фраза "свободный от эндотоксина" или "по существу не содержащий эндотоксина" в целом относится к композициям, растворителям и/или емкостям, которые содержат не более чем следовые количества (например, количества, не оказывающие клинических нежелательных физиологических эффектов у субъекта) эндотоксина и предпочтительно не поддающиеся выявлению количества эндотоксина. Эндотоксины представляют собой токсины, связанные с конкретными бактериями, как правило, грамотрицательными бактериями, несмотря на то, что эндотоксины могут быть найдены в грамположительных бактериях, таких как *Listeria monocytogenes*. Наиболее распространенные эндотоксины представляют собой

липополисахариды (LPS) или липоолигосахариды (LOS), обнаруживаемые в наружной мембране различных грамотрицательных бактерий, и являющиеся основным патогенным элементом, придающим способность указанным бактериям вызывать заболевание. Малые количества эндотоксина у людей могут вызывать лихорадку, снижение кровяного давления и активацию воспаления и коагуляцию, среди прочих нежелательных физиологических эффектов.

Таким образом, при фармацевтическом получении полипептидов AARS часто является желательным удалять большую часть или все следы эндотоксина из лекарственных продуктов и/или лекарственных контейнеров, так как даже малые количества могут вызывать нежелательные эффекты у людей. Для указанной цели может использоваться печь для удаления пирогенов, так как для разрушения большинства эндотоксинов, как правило, требуются температуры выше 300°C. Например, в случае материалов первичной упаковки, такой как шприцы или ампулы, комбинация температуры стекла 250°C и время выдержки 30 мин часто является достаточной для достижения снижения уровня эндотоксина на 3 log. Предусмотрены и другие способы удаления эндотоксинов, включая, например, способы хроматографии и фильтрации, описанные в настоящем изобретении и известные в данной области техники. Также включены способы производства полипептидов AARS в и изолирование их из указанных эукариотических клеток, таких как клетки млекопитающих, со сниженным, если не устраненным, риском присутствия эндотоксинов в композиции согласно изобретению. Предпочтительными являются способы производства полипептидов AARS в свободных от сыворотки клетках и изолирование их из указанных свободных от сыворотки клеток. Указанные композиции, содержащие полипептиды AARS, представляют собой новые лекарственные формы, которые проявляют новые биологические и терапевтические характеристики, не наблюдаемые у композиций на основе полипептида AARS, загрязненных сывороткой или эндотоксином, который имеет потенциальную способность связываться с полипептидами AARS и изменять их новые биологические свойства.

Эндотоксины могут быть детектированы с использованием стандартных методов, известных в данной области техники. Например, анализ лизата амебоцитов мечехвоста *Limulus polyphemus*, в котором используется кровь указанного мечехвоста, представляет собой очень чувствительный анализ для выявления присутствия эндотоксина, и реагенты, наборы и приборы для выявления эндотоксина на основе указанного анализа являются коммерчески доступными, например, в компании Lonza Group. В указанном анализе очень низкий уровень LPS может вызывать поддающуюся выявлению коагуляцию лизата *Limulus* из-за интенсивного ферментативного каскада, амплифицирующего указанную реакцию. Эндотоксины также можно количественно оценивать с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). Уровень эндотоксина по существу в свободной от эндотоксина композиции может быть меньше примерно 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,08, 0,09, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ЕЭ эндотоксина/мг белка. Как правило, 1 нг липополисахарида (LPS) соответствует примерно 1-10 ЕЭ (единицам эндотоксина).

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения "чистота" любого конкретного агента (например, белкового фрагмента AARS) в композиции может быть специально определена. Например, конкретные композиции могут содержать агент, который является по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% чистым, включая все десятичные дроби между ними, по результатам измерения с помощью методов, включая, но не ограничиваясь перечисленными: жидкостную хроматографию высокого давления (ЖХВД), хорошо известную форму колоночной хроматографии, часто используемую в биохимии и аналитической химии для разделения, идентификации и количественной оценки соединений.

В настоящем изобретении термины "функция" и "функциональный" и т.п. относятся к биологической, ферментативной или терапевтической функции.

"Ген" означает единицу наследования, которая может занимать специфический локус хромосомы и содержит транскрипционные и/или трансляционные регуляторные последовательности и/или кодирующую область и/или нетранслируемые последовательности (т.е. интроны, 5'- и 3'-нетранслируемые последовательности).

"Гомология" относится к процентному числу аминокислот, которые являются идентичными или составляют консервативные замены. Гомологию можно определить с использованием программ для сравнения последовательностей, таких как GAP (Deveraux et al., 1984, *Nucleic Acids Research* 12, 387-395), которые включены в настоящее изобретение посредством ссылки. Таким образом, последовательности одинаковой или по существу разной длины с последовательностями, приведенными в настоящем изобретении, можно сравнивать путем внесения пропусков в выравнивание, где указанные пропуски определяются, например, с помощью алгоритма сравнения, используемого программой GAP.

Термин "клетка-хозяин" включает отдельную клетку или клеточную культуру, которая может быть реципиентом любого рекомбинантного вектора (векторов), изолированного полинуклеотида или полипептида согласно изобретению. Клетки-хозяева включают потомство одной хозяйской клетки и указанное потомство не обязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или по общей комплементарности ДНК) оригинальной исходной клетке из-за природной, случайной или преднамеренной мутации и/или изменения. Клетка хозяина включает клетки, трансфицированные или инфицированные in

vivo или *in vitro* рекомбинантным вектором или полинуклеотидом согласно изобретению. Клетка-хозяин, которая содержит рекомбинантный вектор согласно изобретению, представляет собой рекомбинантную клетку хозяина.

Термин "изолированный" обозначает материал, который по существу или не по существу свободен от компонентов, которые в норме окружают его в его нативном состоянии. Например, "изолированный полинуклеотид" в настоящем изобретении включает полинуклеотид, который был очищен из последовательности, фланкирующей его в его природном состоянии, например, фрагмент ДНК, который был выделен из последовательностей, которые в норме находятся рядом с фрагментом. В альтернативном варианте "изолированный пептид" или "изолированный полипептид" и т.п., в настоящем изобретении включает *in vitro* изолирование и/или очистку молекулы пептида или полипептида из ее природного клеточного окружения и от ее связи с другими компонентами клетки; т.е. указанная молекула является значительно не связанной с веществами *in vivo*.

Термин "мРНК" или иногда употребляемый термин "мРНК-транскрипт" в настоящем изобретении включает, но не ограничивается перечисленными: пре-мРНК-транскрипт (транскрипты), промежуточные продукты процессинга транскрипта, зрелую (зрелые) мРНК, готовую к трансляции и транскрипции гена или генов, или нуклеиновые кислоты, которые являются производными транскрипта (транскриптов) мРНК. Процессинг транскриптов может включать сплайсинг, редактирование и разрушение. В настоящем изобретении нуклеиновая кислота, произошедшая из мРНК-транскрипта, относится к нуклеиновой кислоте, для синтеза которой мРНК-транскрипт или его субпоследовательность в конечном итоге служит в качестве матрицы. кДНК обратно транскрибированная из мРНК, РНК, транскрибированная из указанной кДНК, ДНК, амплифицированная из кДНК, РНК, транскрибированная из амплифицированной ДНК, и т.д., являются произошедшими из мРНК-транскрипта, и детектирование таких производных продуктов указывает на присутствие и/или избыток исходного транскрипта в образце. Таким образом, полученные из мРНК образцы включают, но не ограничиваются перечисленными: мРНК-транскрипты гена или генов, кДНК, обратно транскрибированную из мРНК, кРНК, транскрибированную из кДНК, ДНК, амплифицированную из генов, РНК, транскрибированную из амплифицированной ДНК и т.п.

"Неканонические" виды активности в настоящем изобретении в целом относятся либо i) к новым видам активности, которыми обладает полипептид AARS согласно изобретению, которыми не обладает в какой-либо значительной степени интактный нативный полноразмерный исходный белок, либо ii) виды активности, которыми обладал интактный нативный полноразмерный исходный белок, причем полипептид AARS либо проявляет значительно более высокую (т.е. по меньшей мере на 20% превышающую) специфическую активность по сравнению с интактным нативным полноразмерным исходным белком, либо проявляет активность в новом контексте; например, в результате выделения указанной активности из других видов активности, которыми обладает интактный нативный полноразмерный исходный белок. В случае полипептидов AARS неограничивающие примеры неканонических видов активности включают внеклеточный сигналинг, связывание с РНК, связывание с аминокислотами, модуляцию пролиферации клеток, модуляцию миграции клеток, модуляцию дифференцировки клеток (например, гематопозеза, нейрогенеза, миогенеза, остеогенеза и адипогенеза), модуляцию транскрипции генов, модуляцию апоптоза или других форм клеточной гибели, модуляцию клеточной передачи сигнала, модуляцию клеточного поглощения или секреции, модуляцию ангиогенеза, модуляцию клеточного связывания, модуляцию клеточного метаболизма, модуляцию продукции или активности цитокинов, модуляцию активности цитокиновых рецепторов, модуляцию воспаления и т.п.

Термин "полумаксимальная эффективная концентрация" или "EC₅₀" относится к концентрации белкового фрагмента AARS, антитела или другого агента, описанного в настоящем изобретении, при которой вызываемый им эффект находится посередине между исходным и максимальным эффектом после некоторого определенного времени воздействия; EC₅₀ для кривой зависимости эффекта от определенной дозы, таким образом, обозначает концентрацию соединения, при которой наблюдается 50% его максимального эффекта. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения EC₅₀ агента, предложенного в настоящем изобретении, указывается в отношении "неканонической" активности, как отмечено выше. EC₅₀ также обозначает плазматическую концентрацию, необходимую для достижения 50% максимального эффекта *in vivo*. Подобным образом, "EC₉₀" относится к концентрации агента или композиции, при которой наблюдается 90% ее максимального эффекта. "EC₉₀" можно рассчитать из "EC₅₀" и наклона кривой зависимости или можно определить непосредственно из данных с использованием стандартных навыков в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения значение EC₅₀ белкового фрагмента AARS, антитела или другого агента составляет меньше примерно 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 нМ. Предпочтительно, значение EC₅₀ биотерапевтической композиции составляет примерно 1 нМ или менее.

Термин "модуляция" включает "повышение" или "стимулирование", а также "снижение" или "уменьшение", как правило, на статистически значимом или физиологически значимом уровне, по сравнению с контролем. Соответственно, "модулятор" может представлять собой агонист, антагонист или любую их смесь в зависимости от используемых условий. "Повышенное" или "увеличенное" количество,

как правило, является "статистически значимым" количеством и может включать повышение в 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 или более раз (например, в 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятичные дроби между ними, превышающие 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, и т.д.) количества, продуцируемого в отсутствие композиции (в отсутствие агента или соединения), или контрольной композиции. "Сниженное" или уменьшенное количество, как правило, представляет собой "статистически значимое" количество и может включать снижение на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% количества, продуцируемого в отсутствие композиции (в отсутствие агента или соединения) или в присутствии контрольной композиции, включая все целые числа между ними. В качестве одного неограничивающего примера, контроль для сравнения традиционных и неканонических видов активности может включать сравнение интересующего белкового фрагмента AARS с его соответствующим полноразмерным белком AARS, или фрагмента AARS, обладающего сравнимыми традиционными видами активности, с его соответствующим полноразмерным AARS. Другие примеры "статистически значимых" количеств описаны в настоящем изобретении.

"Полученный из" (производный) означает, что образец, такой как, например, полинуклеотидный экстракт или полипептидный экстракт, был выделен или получен из конкретного источника субъекта. Например, экстракт может быть получен из ткани или биологической жидкости, непосредственно изолированной из субъекта. "Производный" или "полученный из" также может относиться к источнику полипептидной или полинуклеотидной последовательности. Например, последовательность AARS согласно настоящему изобретению может "происходить" из информации последовательности протеолитического фрагмента AARS или сплайс-варианта AARS, или его части, полученной естественным или искусственным путем и, таким образом, может содержать, по существу состоять из или состоять из указанной последовательности.

Термины "полипептид" и "белок" являются взаимозаменяемыми в настоящем изобретении и относятся к полимеру аминокислотных остатков и к их вариантам и синтетическим и природным аналогам. Таким образом, указанные термины относятся к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков являются синтетическими неприродными аминокислотами, такими как химический аналог соответствующей природной аминокислоты, также как и природным аминокислотным полимерам и их природным химическим производным. Указанные производные включают, например, продукты пост-трансляционной модификации и разрушения, включая пироглутамил, изо-гистидил, протеолитические, фосфорилированные, гликозилированные, окисленные, изомеризованные и дезаминированные варианты эталонного фрагмента AARS.

Фразы "идентичная по последовательности" или, например, содержащий "последовательность, на 50% идентичную" в настоящем изобретении относятся к тому, насколько последовательности являются идентичными на основе нуклеотидов или аминокислот в области окна сравнения. Таким образом, "процентная идентичность по последовательности" может быть рассчитана путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, определения числа положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты (например, A, T, C, G, I) или идентичный аминокислотный остаток (например, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met) встречается в обеих последовательностях, для получения числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения (т.е. размер окна) и умножения результата на 100 для получения процентной идентичности по последовательности.

Термины, используемые для описания отношений между двумя или более последовательностями полинуклеотидов или полипептидов, включают "эталонную последовательность", "окно сравнения", "идентичность по последовательности", "процентную идентичность по последовательности" и "фактическую идентичность". "Эталонная последовательность" составляет по меньшей мере 12, но часто от 15 до 18 и часто по меньшей мере 25 мономерных единиц, включая нуклеотиды и аминокислотные остатки, в длину. Так как каждый из двух полинуклеотидов может содержать (1) последовательность (т.е. только часть полной полинуклеотидной последовательности), которая является одинаковой между двумя полинуклеотидами и (2) последовательность, которая различается между двумя полинуклеотидами, сравнения по последовательности между двумя (или более) полинуклеотидами, как правило, проводится путем сравнения по последовательности двух полинуклеотидов в пределах "окна сравнения" для идентификации и сравнения ограниченных участков подобия по последовательности. "Окно сравнения" относится к смысловому сегменту, состоящему по меньшей мере из 6 заменимых положений, обычно примерно от 50 до примерно 100, чаще от примерно 100 до примерно 150, в которых данная последовательность сравнивается с эталонной последовательностью, содержащей такое же количество заменимых положений, после оптимального выравнивания двух последовательностей. Окно сравнения может включать добавления или делеции (т.е. пропуски), составляющие примерно 20% или менее, по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавления или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательности для выравнивания окна сравнения можно проводить путем компьютерного применения алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программе Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Висконсин, США) или путем проверки и оптимального выравнивания (т.е. полученного при

максимальной процентной гомологии в пределах окна сравнения), осуществленного с помощью любого из различных выбранных способов. Также следует отметить семейство программ BLAST, например, описанных Альтшулем (Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389). Подробное обсуждение анализа последовательности можно найти в источнике Unit 19,3 of Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, глава 15.

Расчет подобия последовательности или идентичности последовательности между последовательностями (термины являются взаимозаменяемыми в настоящем изобретении) проводили, как описано далее. Для определения процентной идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновых кислот, последовательности выравнивали для оптимального сравнения (например, пропуски (gaps) могут вводиться в одну, или в обе, из первой и второй последовательностей аминокислот или нуклеиновых кислот для оптимального выравнивания и не гомологичные последовательности могут быть исключены из сравнения). Согласно конкретным вариантам реализации изобретения длина эталонной последовательности, которую выравнивают в целях сравнения, составляет по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50, 60% и еще более предпочтительно по меньшей мере 70, 80, 90, 100% от длины эталонной последовательности. Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или нуклеотидов. Когда положение в первой последовательности занято таким же аминокислотным остатком или нуклеотидом, как соответствующее положение во второй последовательности, тогда молекулы являются идентичными по этому положению.

Процентная идентичность между двумя последовательностями представляет собой функцию числа идентичных положений, одинаковых в последовательностях, с учетом числа пропусков и длины каждого пропуска, которые необходимо вводить для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности между двумя последовательностями может осуществляться с использованием математического алгоритма. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения процентную идентичность между двумя аминокислотными последовательностями определяли с использованием алгоритма Нидлмана и Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 444-453), который был включен в программу GAP пакета программного обеспечения GCG (доступного по электронному адресу <http://www.gcg.com>), с использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250 и цены пропуска 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и цены длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Согласно другому предпочтительному варианту реализации изобретения процентную идентичность между двумя нуклеотидными последовательностями определяли с использованием программы GAP пакета программного обеспечения GCG (доступного по ссылке <http://www.gcg.com>), с использованием матрицы NWSgap-ДНК.СМР и цены пропуска 40, 50, 60, 70 или 80 и цены длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Особо предпочтительный набор параметров (и тот, который следует использовать, если иное не указано) представляет собой матрицу счета Blossum 62 (штраф за пропуск 12, штраф за продолжение пропуска 4, и штраф за пропуск сдвига рамки считывания 5).

Процентную идентичность между двумя аминокислотными или нуклеотидными последовательностями можно определить с использованием алгоритма Мейерса и Миллера (E. Meyers and W. Miller, 1989, Cabios, 4: 11-17), который был включен в программу ALIGN (версия 2,0), с использованием таблицы цены остатков PAM120, штрафа за длину пропуска, равного 12, и штрафа за пропуск, равного 4.

Последовательности нуклеиновых кислот и белков, описанные в настоящем изобретении, можно применять как "искомые последовательности" для проведения поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации других членов семейства или родственных последовательностей. Указанные поиски можно проводить с использованием программ NBLAST и XBLAST (версия 2,0) согласно Альтшулю (Altschul, et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-10). Поиски нуклеотида в базе BLAST можно осуществить с помощью программы NBLAST (очки = 100, длина слова = 12) для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекуле нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Поиски белка в базе BLAST можно осуществлять с помощью программы XBLAST (очки = 50, длина слова = 3) для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекуле белка согласно изобретению. Для получения выравнивания с пропусками (gaps) для сравнения можно использовать программу Gapped BLAST, как описано в источнике Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res, 25: 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно применять параметры, установленные по умолчанию для соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

Термин "растворимость" относится к способности агента, предложенного в настоящем изобретении, растворяться в жидком растворителе и образовывать однородный раствор. Растворимость, как правило, выражается как концентрация на основе массы растворенного вещества на единицу объема растворителя (г растворенного вещества на кг растворителя, г на дл (100 мл), мг/мл и т.д.), молярности, молярности, мольной доли или других подобных единиц концентрации. Максимальное равновесное количество растворенного вещества, которое может раствориться, на количество растворителя, представляет собой растворимость указанного растворенного вещества в указанном растворителе при конкретных условиях, включая температуру, давление, pH и природу растворителя. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения растворимость измеряют при физиологическом pH. Согласно конкретным вари-

антам реализации изобретения измеряют растворимость в воде или физиологическом буфере, таком как ФСБ. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения измеряют растворимость в биологической жидкости (растворителе), таком как кровь или сыворотка. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения температура может быть примерно равна комнатной температуре (например, примерно 20, 21, 22, 23, 24, 25°C) или примерно равна температуре тела (37°C). Согласно конкретным вариантам реализации изобретения агент, такой как белковый фрагмент AARS, имеет растворимость по меньшей мере примерно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 или 30 мг/мл при комнатной температуре или при 37°C.

"Граница сплайсинга" в настоящем изобретении включает область зрелого мРНК-транскрипта или кодируемого полипептида, в котором 3'-конец первого экзона соединяется с 5'-концом второго экзона. Размер участка может варьировать и может включать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более (включая все целые числа между ними), нуклеотидных или аминокислотных остатков с любой стороны конкретных остатков, где 3'-конец одного экзона соединяется с 5'-концом другого экзона. Термин "экзон" относится к последовательности нуклеиновых кислот, которая представлена в зрелой форме молекулы РНК после того, как какие-либо части предшественника РНК (интроны) были удалены путем цис-сплайсинга, или две или более молекулы предшественников РНК были лигированы путем транс-сплайсинга. Зрелая молекула РНК может представлять собой матричную РНК или функциональную форму некодирующей РНК, такую как рРНК или тРНК. В зависимости от контекста, экзон может относиться к последовательности в ДНК или ее РНК-транскрипте. Термин "интрон" относится к некодирующему участку нуклеиновой кислоты в гене, который не транслируется в белок. Некодирующие интронные участки транскрибируются с получением предшественника мРНК (пре-мРНК) и некоторых других РНК (таких как длинные некодирующие РНК) и затем удаляются путем сплайсинга во время процессинга с образованием зрелой РНК.

Термин "сплайс-вариант" относится к зрелой мРНК и кодируемому ею белку, который продуцируется путем альтернативного сплайсинга, процесса, в результате которого экзоны РНК (первичного транскрипта гена или пре-мРНК) заново соединяются несколькими путями во время сплайсинга РНК. Полученные в результате разные мРНК могут транслироваться в различные изоформы белка, позволяя одному гену кодировать несколько белков.

Термин "субъект" в настоящем изобретении включает любое животное, которое проявляет симптом или находится в группе риска проявления указанного симптома, который можно лечить или диагностировать с помощью полинуклеотида полипептида AARS или согласно изобретению. Также включены субъекты, для которых является желательным анализ уровня полипептидов и/или полинуклеотидов AARS согласно изобретению, в диагностических или других целях. Подходящие субъекты (пациенты) включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик или морская свинка), сельскохозяйственных животных и домашних животных или питомцев (таких как кошка или собака). Включены приматы, отличные от человека, и, предпочтительно, пациенты, представляющие собой человека.

"Лечение" или "осуществление лечения" в настоящем изобретении включает любой желательный эффект на симптомы или патологию заболевания или состояния, на которые могут влиять неканонические виды активности полинуклеотида или полипептида AARS, описанного в настоящем изобретении, и может включать даже минимальные изменения или улучшения одного или более измеряемых маркеров заболевания или состояния, подвергаемого лечению. Также включено лечение, которое относится к терапии без использования AARS, в котором последовательность AARS, описанная в настоящем изобретении, обеспечивает клинический маркер лечения. "Лечение" или "проведение лечения" не обязательно означает полное устранение или вылечивание заболевания или состояния или связанных с ними симптомов. Субъект, получающий указанное лечение, представляет собой любого субъекта, нуждающегося в указанном лечении. Примеры маркеров клинического улучшения очевидны специалистам в данной области техники.

Для практического осуществления настоящего изобретения, если иное специально не указано, используют стандартные методы молекулярной биологии и рекомбинантной ДНК в пределах данной области техники, многие из которых описаны ниже в качестве иллюстрации. Указанные методы подробно описаны в литературе. См., например,

Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2000); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications* (P. Herdewijn, ed., 2004); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Nucleic Acid Hybridization: Modern Applications* (Buzdin and Lukyanov, eds., 2009); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); Freshney, R.I. (2005) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 5th Ed. Hoboken NJ, John Wiley & Sons; B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (3rd Edition 2010); Farrell, R., *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization* (3rd Edition 2005), *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press; *Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol № I* by Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow (1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-544-7); *Antibodies: A Laboratory Manual* by Ed Harlow (Editor), David Lane (Editor) (1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-3, 4-2), 1855. *Handbook of Drug Screening*, edited by Ramakrishna Seethala, Prabhavathi B. Fernandes (2001, New York, N.Y., Marcel Dekker, ISBN 0-8247-0562-9); и *Lab Ref: A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench*, Edited Jane Roskams and Linda Rodgers, (2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-630-3).

Все публикации, патенты и патентные заявки, цитированные в настоящем изобретении, таким образом, полностью включены в настоящее изобретение посредством ссылки.

III. Очищенные белковые фрагменты AARS и варианты для терапевтического и других применений.

Неожиданным образом было обнаружено, что фрагменты AARS, в отличие от их исходных полно-размерных последовательностей, для которых известны только виды активности, связанные с аминокислот-рилизацией, обладают биологическими видами активности, важными для применения в биотерапевтических, исследовательских и диагностических целях. Варианты реализации настоящего изобретения, таким образом, включают полноразмерные белки, зрелые изоформы белков и белковые фрагменты аминокислот-рилизаторов (AARS), а также их биологически активные варианты и их фрагменты. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения указанные белки и фрагменты могут образовываться в результате эндогенного протеолиза, *in vitro* протеолиза, сплайсинга или предсказания с помощью компьютерного моделирования, и другими путями. Белковые фрагменты AARS, описанные в настоящем изобретении, и их варианты, могут обладать по меньшей мере одной "неканонической" биологической активностью. Белковый фрагмент (фрагменты) AARS согласно настоящему изобретению также называется в настоящем изобретении "полипептидом AARS" или "эталонным полипептидом AARS". Согласно конкретным вариантам реализации изобретения полипептиды AARS, предложенные в настоящем изобретении, содержат или по существу состоят из всего или части полипептида "эталонной последовательности (последовательностей)" AARS, описанной в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, ниже, которая представляет собой аминокислотную последовательность (последовательности) различных фрагментов гистидил-тРНК-синтетазы. Белковые последовательности AARS мыши и человека являются сильно родственными, различаясь, как правило, не более чем по нескольким аминокислотам в целой последовательности, конкретном домене или конкретном белковом фрагменте.

N-концевые полипептиды AARS: (табл. 1, 2 и 3).

Таблица 1А

Полипептиды AARS, идентифицированные с помощью МС

| Название | Тип/вид/Остатки | Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот | SEQ ID NO: |
|----------------------|-------------------------|--|------------------|
| HisRS1 ^{N1} | Белок/Человек/ 1-141 | MAERAAL EELVKLQGERVRLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLKALGPDESQKQFVLK TPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVI IRCFKRHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLI YDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAM | SEQ ID NO: 12 |
| HisRS1 ^{N1} | ДНК/Человек/ | ATGGCAGAGCGTGC GGCGCTGGAGGAGCTGGTGAAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGA GGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTC CTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTCAAA ACCCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCCGGCAGATGGCAGTTCGCGAGAAGGTG TTTGACGTAATCATCCGTTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAGAAGTCATTGATACACCT GTATTTGAACTAAAGGAAACACTGATGGGAAAGTATGGGGAAGACTCCAAGCTTATC TATGACCTGAAGACCAGGGCGGGGAGCTCCTGTCCCTTCGCTATGACCTCACTGTT CCTTTTGCTCGGTATTTGGCAATG | SEQ ID NO: 13 |
| HisRS1 ^{N2} | Белок/Человек/ 1-408 | MAERAAL EELVKLQGERVRLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLKALGPDESQKQFVLK TPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVI IRCFKRHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLI YDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYREF YQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVNDRI LDGMFAICGVSD SKFRTICSSVDKLDKVSWEVKNEVMGEKGLAPEVADRIGDYVQHHGVSLVEQLLQ DPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQ TPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEA LEEKIRTTE | SEQ ID NO: 14 |
| HisRS1 ^{N2} | ДНК/Человек/ | ATGGCAGAGCGTGC GGCGCTGGAGGAGCTGGTGAAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGA GGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTC CTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTCAAA ACCCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCCGGCAGATGGCAGTTCGCGAGAAGGTG TTTGACGTAATCATCCGTTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAGAAGTCATTGATACACCT GTATTTGAACTAAAGGAAACACTGATGGGAAAGTATGGGGAAGACTCCAAGCTTATC TATGACCTGAAGACCAGGGCGGGGAGCTCCTGTCCCTTCGCTATGACCTCACTGTT CCTTTTGCTCGGTATTTGGCAATGAATAAACTGACCAACATTAACAGCTACCACATA GCAAAGGTATATCGGCGGGATAACCCAGCCATGACCCGTGGCCGATACCGGGAATTC TACCAGTGTGATTTTGACATTGCTGGGAACTTTGATCCCATGATCCCTGATGCAGAG TGCCTGAAGATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCACCTCAGATAGGCGACTTCCTGGTC AAGGTAAACGATCGACGATTTCTAGATGGGATGTTTGCTATCTGTGGTGTTTCTGAC AGCAAGTCCGTACCATCTGCTCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAGGTGCTCTGGGAA GAGGTGAAGAATGAGATGGTGGGAGAGAAGGGCCTTGACCTGAGGTGGCTGACCGC ATTGGGGACTATGTCCAGCAACATGGTGGGGTATCCCTGGTGGAACAGCTGCTCCAG GATCCTAAACTATCCCAAAACAAGCAGGCCTTGAGGGCCTGGGAGACCTGAAGTTG CTCTTTGAGTACCTGACCTATTTGGCATTGATGACAAAATCTCCTTTGACCTGAGC CTTGCTCGAGGGCTGGATTACTACACTGGGGTGATCTATGAGGCAGTGCTGCTACAG ACCCAGCCAGGCAGGGGAAGAGCCCTGGGTGTGGGCAGTGTGGCTGCTGGAGGA CGCTATGATGGGCTAGTGGGCATGTTTCGACCCCAAAGGGCGCAAGGTGCCATGTGTG GGGCTCAGCATTTGGGTGGAGCGGATTTCTCCATCGTGGAACAGAGACTAGAGGCT TTGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAG | SEQ ID NO: 15 |

Таблица 1В

Выявленные с помощью масс-спектрометрии пептиды HisRS1^{N1} и предполагаемые связывающие пептиды

| Тип/вид | Последовательность | SEQ ID NO: |
|------------|--|---------------|
| Белок/мышь | ASAEQIEEEVTK | SEQ ID NO: 16 |
| Белок/мышь | LLKLKALGQDEGKQKFLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVI IRCFKR | SEQ ID NO: 17 |
| Белок/мышь | HGA EVIDTPVFELK | SEQ ID NO: 18 |
| Белок/мышь | ETLTGKYGEDSKLIYDLK | SEQ ID NO: 19 |
| Белок/мышь | DQGGELLSLR | SEQ ID NO: 20 |

Таблица 1С

Составленные последовательности HisRS1^{N1} на основе выявленных с помощью масс-спектрометрии пептидов

| Тип/вид | Последовательность | SEQ ID NO: |
|------------|--|------------------|
| Белок/мышь | ASAEQIEEEVTKLLKLKAQLGQDEGKQKFVLKTPKGRDYSRQMAVREKVFVDVIIRCFKRHGAEVIDTPV FELKETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLR | SEQ ID NO: 21 |

Таблица 1D

Выявленные с помощью масс-спектрометрии пептиды HisRS1^{N21} и предполагаемые связывающие пептиды

| Тип/вид | Последовательность | SEQ ID NO: |
|------------|--|---------------|
| Белок/мышь | HGAEVIDTPVFELK | SEQ ID NO: 22 |
| Белок/мышь | ETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSRLYDLTPVFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYR EFYQCDFDIAGQFDPMPDAECLKIMCEILSSLQIGNFLVKVNDRRILDGMFAVCGVPDSKFRITCSSV DKLDKVSWEVKNEVMVGEKGLAPEVADR | SEQ ID NO: 23 |
| Белок/мышь | IGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPK | SEQ ID NO: 24 |

Таблица 1E

Составленные последовательности HisRS1^{N1} на основе выявленных с помощью масс-спектрометрии пептидов

| Тип/вид | Последовательность | SEQ ID NO: |
|------------|--|---------------|
| Белок/мышь | HGAEVIDTPVFELKETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSRLYDLTPVFARYLAMNKLNIKRYHIAK VYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMPDAECLKIMCEILSSLQIGNFLVKVNDRRILDGMFA VCGVPDSKFRITCSSVDKLDKVSWEVKNEVMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPK | SEQ ID NO: 25 |

Таблица 2A

Полипептиды и альтернативные транскрипты AARS, идентифицированные методом глубокого секвенирования

| Название | Тип/вид/Остатки | Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот | SEQ ID NO: |
|----------------------|------------------------------|---|---------------|
| HisRS1 ^{N4} | Белок/Человек/ 1-60 | MAERAALVELVQLQGERVRLKQKQKASAELEEEVAKLLKLKAQLGPDSEKQKFV LKTPK | SEQ ID NO: 26 |
| HisRS1 ^{N4} | ДНК/Человек | ATGGCAGAGCGTGC GGCGCTGGAGGAGCTGGTGAACCTCAGGGAGAGCGCGTGC GAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGAGGTGGCGAA ACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTG CTCAAACCCCAAG | SEQ ID NO: 27 |
| HisRS1 ^{N5} | Белок/Человек/ 1-243+27aa | MAERAALVELVQLQGERVRLKQKQKASAELEEEVAKLLKLKAQLGPDSEKQKFV LKTPKGRDYSRQMAVREKVFVDVIIRCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGED SKLIYDLKDQGGELLSRLYDLTPVFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAMTR GRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVNDRRILDGM FAICGVSDSKFRITCSSVDKLDKVGYPWWNSCSRILNYPKTSRPRAWET | SEQ ID NO: 28 |
| HisRS1 ^{N5} | ДНК/Человек | ATGGCAGAGCGTGC GGCGCTGGAGGAGCTGGTGAACCTCAGGGAGAGCGCGTGC GAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGAGGTGGCGAA ACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTG CTCAAACCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCGGCAGATGGCAGTTCGCG AGAAGGTGTTGACGTAATCATCCGTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAGAAGTCAT TGATACACCTGTATTTGAACTAAAGGAAACACTGATGGGAAAGTATGGGGAAGAC TCCAAGCTTATCTATGACCTGAAGGACCAGGGCGGGGAGCTCCTGTCCCTTCGCT ATGACCTCACTGTCTCTTTGCTCGGTATTTGGCAATGAATAAAGTACCAACAT | SEQ ID NO: 29 |
| | | TAAACGCTACCACATAGCAAAGGTATATCGCGGGATAACCCAGCCATGACCCGT GGCCGATACCGGGAATTCTACAGTGTGATTTTGACATTGCTGGGAACCTTTGATC CCATGATCCCTGATGCAGAGTGCCTGAAGATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCAC TCAGATAGGCGACTTCTGGTCAAGGTAAACGATCGACGCTTCTAGATGGGATG TTTGCTATCTGTGGTGTCTTCTGACAGCAAGTCCGTACCATCTGCTCCTCAGTAG ACAAGCTGGACAAGGTGGGTATCCCTGGTGAACAGCTGCTCCAGGATCCTAAA CTATCCCAAACAAGCAGGCCTTGGAGGGCCTGGGAGACCTGA | |

Таблица 2В

Уникальные границы сплайсинга полипептидов AARS

| Название | Тип/вид | Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот в области уникальной границы сплайсинга | SEQ ID NO: |
|----------|---------------|---|---------------|
| H1-SV09 | ДНК/Человек/ | GAAATTGTGCTCAAAACCCCCAAG TAGAGACGAGGTTTCACCATGTTGG | SEQ ID NO: 30 |
| | Белок/Человек | KFVLKTPK | SEQ ID NO: 31 |
| H1-AS05 | ДНК/Человек/ | CTCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAG GTGGGGTATCCCTGGTGGAACAGCT | SEQ ID NO: 32 |
| | Белок/Человек | SSVDKLDKVGYPWWNS | SEQ ID NO: 33 |

Таблица 3

Полипептиды и нуклеиновые кислоты AARS, идентифицированные с помощью биоинформатики

| Название | Тип/вид/остатки | Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот | SEQ ID NO: |
|----------------------|-------------------------|---|---------------|
| HisRS1 ^{N3} | Белок/Человек/ 1-113 | MAERAAL EELVKLGGERVRLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKF VLKTPKGT RDYSPRQMAVREKVF DVI IRCFKRHGA EVIDTPVFELKETLMGKYG EDSKL | SEQ ID NO: 34 |
| HisRS1 ^{N3} | ДНК/Человек | ATGGCAGAGCGTGC GCGCTGGAGGAGCTGGTGA AACTTCAGGGAGAGCGCGTG CGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCG AACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCCTGATGAAAGCAAACAGAAATTT GTGCTCAAAACCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCGGCAGATGGCAGTT CGCGAGAAGGTGTTTGACGTAATCATCCGTTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAGAA GTCATTGATACACCTGTATTTGAACTAAAGGAAACACTGATGGGAAAGTATGGG GAAGACTCCAAGCTT | SEQ ID NO: 35 |

С-концевые полипептиды AARS: (табл. 4, 5 и 6).

Таблица 4А

Полипептиды AARS, идентифицированные с помощью MC

| Название | Тип/вид/остатки | Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот | SEQ ID NO: |
|----------|-----------------|---|------------|
|----------|-----------------|---|------------|

Таблица 4В

Выявленные с помощью масс-спектрометрии пептиды и предполагаемые связывающие пептиды

| Тип/вид | Последовательность | SEQ ID NO: |
|---------|--------------------|------------|
|---------|--------------------|------------|

Таблица 4С

Составленные последовательности на основе выявленных с помощью масс-спектрометрии пептидов

| Тип/вид | Последовательность | SEQ ID NO: |
|---------|--------------------|------------|
|---------|--------------------|------------|

Таблица 5А

Полипептиды и альтернативные транскрипты AARS, идентифицированные методом глубокого секвенирования

| Название | Тип/вид/Остатки | Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот | SEQ ID NO: |
|----------------------|------------------------------------|--|------------------|
| HisRS1 ^{C2} | Белок/ Человек/ 1-60+175-509 | MAERAAL EELVKLGGERVRLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVL KTPKDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVNDRRI LDGMFAICGV SDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVAD RIGDYVQQHGGVSLVEQ LLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEA VLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVP CVGLSIGVERIFSIVE QRLEALEEKIRT TETQVLVSAQKLL EERLKL VSELWDAG IKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPL CIC | SEQ ID NO: 48 |

| | | | |
|----------------------|------------------------------------|--|------------------|
| HisRS1 ^{c2} | ДНК/Человек | ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCG AGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAAC TCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTC AAAACCCCAAGGATTTTGACATTGCTGGGAACCTTGATCCCATGATCCCTGATGC AGAGTGCCTGAAGATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCACCTCAGATAGGCGACTTCC TGGTCAAGGTAAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGTTTGCTATCTGTGGTGTT TCTGACAGCAAGTTCCTGACCATCTGCTCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAGGTGTC CTGGGAAGAGGTGAAGAATGAGATGGTGGGAGAGAAGGCCCTTGACCTGAGGTGG CTGACCGCATTTGGGACTATGTCCAGCAACATGGTGGGTATCCCTGGTGGAACAG CTGCTCCAGGATCCTAAACTATCCCAAACAGCAGGCCTTGAGAGGCCTGGGAGA CCTGAAGTTGCTCTTTGAGTACCTGACCCATTGTCGATTGATGACAAAATCTCCT TTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTACACTGGGGTGATCTATGAGGCA GTGCTGCTACAGACCCAGCCAGGCAGGGGAAGAGCCCTGGGTGTGGCGAGTGT GGCTGCTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGGCATGTTGACCCCAAAGGGCGCA AGGTGCCATGTGTGGGCTCAGCATTTGGGTGGAGCGGATTTTCTCCATCGTGGAA CAGAGACTAGAGGCTTTGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGT GGCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCTTGTCTCAGAACTGT GGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCCAAAGCTACTGAAC CAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCCACTGGTGGCTATCATCGCGAGCA GGAACCAAGGATGGGGTCATCAAGCTCCGTTCAGTGACGAGCAGGGAAGAGGTGG ATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAAAGGAGAACAGGCCAGCCCCCTC TGCATCTGCTGA | SEQ ID NO: 49 |
| HisRS1 ^{c3} | Белок/ Человек/ 1-60+211-509 | MAERAALVELVQLQGERVRLKQOKASAELEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFLV KTPKVNDRIIDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEVKNMVGEKGLAPE VADRIGDYVQHHGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLDLKLLFEYLTFLFGIDDKI SFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKG RKVPVGLSIGVERIFSIQERLEALEEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERKLVS LWDAGIKAEELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREE VDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC | SEQ ID NO: 50 |
| HisRS1 ^{c3} | ДНК/Человек | ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCG AGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAAC TCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTC AAAACCCCAAGGTAAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGTTTGCTATCTGTGG TGTTTCTGACAGCAAGTTCCTGACCATCTGCTCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAGG TGTCCTGGGAAGAGGTGAAGAATGAGATGGTGGGAGAGAAGGCCCTTGACCTGAG GTGGCTGACCGCATTTGGGACTATGTCCAGCAACATGGTGGGTATCCCTGGTGGA ACAGCTGCTCCAGGATCCTAAACTATCCCAAACAAGCAGGCCTTGAGGGCCTGG GAGACCTGAAGTTGCTCTTTGAGTACCTGACCCATTGTCGATTGATGACAAAATC TCCTTTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTACACTGGGGTGATCTATGA GGCAGTGCTGCTACAGACCCAGCCAGGCAGGGGAAGAGCCCTGGGTGTGGGCA GTGTGGCTGCTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGGCATGTTGACCCCAAAGGG CGCAAGGTGCCATGTGTGGGCTCAGCATTTGGGTGGAGCGGATTTTCTCCATCGT GGAACAGAGACTAGAGGCTTTGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGC TTGTGGCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCTTGTCTCAGAA CTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCCAAAGCTACT | SEQ ID NO: 51 |

| | | | |
|----------------------|---|---|------------------|
| | | GAACCAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCCACTGGTGGCTATCATCGGCG AGCAGGAAGTCAAGGATGGGGTCATCAAGCTCCGTTCACTGACGAGCAGGGAAGAG GTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAAAGGAGAACAGGCCAGCC CCTCTGCATCTGCTGA | |
| HisRS1 ^{c4} | Белок/ Человек/ 1-100+211- 509 | MAERAALVELVQLQGERVRLKQKASAELEEEVAKLLKLAQLGPDESKQKFVL KTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVIIRCFKRHGAVIDTPVFELKVNDRRLDGMFA ICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEVKEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQHHGGVS LVEQLLQDPKLSQNKQALEGLDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLDYYTGV IYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPVGLSIGVERIF SIVEQRLEALEEKIRTTETQVLVSAQKLLERLKLSELWDAGIKAELLYKKNP KLLNQLQYCEEAGIPLVAIIQEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GQPLCIC | SEQ ID NO: 52 |
| HisRS1 ^{c4} | ДНК/Человек | ATGGCAGAGCGTGCAGGCTGGAGGAGCTGGTGAACCTCAGGGAGAGCGCGTGC AGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAAC TCCTGAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTC AAAACCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCGGCAGATGGCAGTTCGCGAGAA GGTGTGTTGACGTAATCATCCGTTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAGAAGTCATTGATA CACCTGTATTTGAACATAAGGTAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGTTTGTCT ATCTGTGGTGTGTTCTGACAGCAAGTTCCGTACCATCTGCTCCTCAGTAGACAAGCT GGACAAGGTGTCCTGGGAAGAGGTGAAGAATGAGATGGTGGGAGAGAAGGCGCTTG CACCTGAGGTGGCTGACCGCATTTGGGGACTATGTCCAGCAACATGGTGGGGTATCC CTGGTGAACAGCTGCTCCAGGATCCTAACTATCCCAAAACAAGCAGGCCTTGGA GGGCCTGGGAGACCTGAAGTTGCTCTTTGAGTACCTGACCTATTTGGCATTGATG | SEQ ID NO: 53 |
| | | ACAAAATCTCCTTTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTACACTGGGGTG ATCTATGAGGCAGTGCTGTACAGACCCAGCCAGGCAGGGGAAGAGCCCTGGG TGTGGGCAGTGTGGCTGCTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGGCATGTTTCGACC CCAAAGGGCGCAAGGTGCCATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGGTGGAGCGGATTTTC TCCATCGTGAACAGAGACTAGAGGCTTTGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGAC ACAGGTGCTTGTGGCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCTTG TCTCAGAACTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCA AAGCTACTGAACAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCCACTGGTGGCTAT CATCGGCAGCAGGAACCAAGGATGGGGTCATCAAGCTCCGTTCACTGACGAGCA GGGAAGAGGTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAAAGGAGAAC GGCCAGCCCTCTGCATCTGCTGA | |
| HisRS1 ^{c5} | Белок/ Человек/ 1-174+211- 509 | MAERAALVELVQLQGERVRLKQKASAELEEEVAKLLKLAQLGPDESKQKFVL KTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVIIRCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSK LIYDLKDQGGELLSRLYDLTPVFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRY REFYQCVNDRRLDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEVKEMVGEKGLA PEVADRIGDYVQHHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLDLKLLFEYLTFLGIDD KISFDLSLARGLDYYTGV IYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDP KGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLVSAQKLLERLKL SELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIQEQLKDGVIKLSVTSR EEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC | SEQ ID NO: 54 |

| | | | |
|----------------------|------------------------------------|---|------------------|
| HisRS1 ^{c5} | ДНК/Человек | ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCG AGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAAC TCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTC AAAACCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCCGGCAGATGGCAGTTCGCGAGAA GGTGTTTGACGTAATCATCCGTTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAGAAGTCATTGATA CACCTGTATTTGAACATAAGGAAACACTGATGGGAAAGTATGGGGAAGACTCCAAG CTTATCTATGACCTGAAGGACCAGGGCGGGGAGCTCCTGTCCCTTCGCTATGACCT CACTGTTCCTTTTGCTCGGTATTTGGCAATGAATAAACTGACCAACATTAAACGCT ACCATATAGCAAAGGTATATCGGCGGGATAACCCAGCCATGACCCGTGGCCGATAC CGGGAATTCTACCAAGTGTGTAAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGTTTGCTAT CTGTGGTGTCTTGACAGCAAGTTCCTGACCATCTGCTCCTCAGTAGACAAGCTGG ACAAGGTGTCTGGGAAGAGGTGAAGAATGAGATGGTGGGAGAGAAGGGCCTTGCA CCTGAGGTGGCTGACCGCATTTGGGACTATGTCCAGCAACATGGTGGGGTATCCCT GGTGGAACAGCTGCTCCAGGATCCTAAACTATCCCAAAACAAGCAGGCCTTGAGAG GCCTGGGAGACCTGAAGTTGCTCTTTGAGTACCTGACCTATTTGGCATTGATGAC AAAATCTCCTTTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTACACTGGGGTGAT CTATGAGGCAGTGCTGTACAGACCCAGCCAGGCAGGGGAAGACCCCTGGGTG TGGGCAGTGTTGGCTGTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGCATGTTGACCCCC AAAGGGCGCAAGGTGCCATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGGTGGAGCGGATTTTCTC CATCGTGGAAACAGAGACTAGAGGCTTTGGAGGAGAAGATACGGACCACGAGACAC AGGTGCTTGTGGCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCTTGTC TCAGAACTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGACCCAAA GCTACTGAACCAAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCCACTGGTGGCTATCA | SEQ ID NO: 55 |
| | | TCGGCGAGCAGGAACTCAAGGATGGGGTCATCAAGCTCCGTTCACTGACGAGCAGG GAAGAGGTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAAAAGGAGAACAGG CCAGCCCCCTCTGCATCTGCTGA | |
| HisRS1 ^{c6} | Белок/ Человек/ 1-60+101-509 | MAERAALEELVKLQGERVRLKQKASAELEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVL KTPKETLMKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVFPFARYLAMNKLNIKRYHI AKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAELCKIMCEILSSLQIGDFL VKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEVKNEMVGEKGLAPEVA DRIGDYVQQHGGVSLVEQLLDQPKLSQNKQALEGLGLDLKLLFEYLTLPFGIDDKISF DLSLARGLDYITGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRK VPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSLELW DAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAI IGEQELKDGVIKLRSVTSREEVD VRREDLVEEIKRRTGQPLCIC | SEQ ID NO: 56 |
| HisRS1 ^{c6} | ДНК/Человек | ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCG AGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAAC TCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTC AAAACCCCAAGGAAACACTGATGGGAAAGTATGGGGAAGACTCCAAGCTTATCTA TGACCTGAAGGACCAGGGCGGGGAGCTCCTGTCCCTTCGCTATGACCTCACTGTTC CTTTTGCTCGGTATTTGGCAATGAATAAACTGACCAACATTAAACGCTACCATATA GCAAAGGTATATCGGCGGGATAACCCAGCCATGACCCGTGGCCGATACCGGGAATT CTACCAGTGTGATTTTGACATTGCTGGGAACCTTTGATCCCATGATCCCTGATGCAG AGTGCCTGAAGATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCACTTCAGATAGGCGACTTCCTG GTCAAGGTAAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGTTTGCTATCTGTGGTGTTC TGACAGCAAGTTCGGTACCATCTGCTCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAGGTGCTCT | SEQ ID NO: 57 |

| | | | |
|----------------------|---|--|------------------|
| | | GGGAAGAGGTGAAGAATGAGATGGTGGGAGAGAAGGGCCTTGCACCTGAGGTGGCT GACCGCATTGGGGACTATGTCCAGCAACATGGTGGGGTATCCCTGGTGGAACAGCT GCTCCAGGATCCTAAACTATCCCAAAACAAGCAGGCCTTGGAGGGCCTGGGAGACC TGAAGTTGCTCTTTGAGTACCTGACCCATATTTGGCATTGATGACAAAATCTCCTTT GACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTACACTGGGGTGATCTATGAGGCAGT GCTGCTACAGACCCAGCCAGGCAGGGGAAGAGCCCTGGGTGTGGGCAGTGTGG CTGCTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGGCATGTTGACCCCAAAGGGCGCAAG GTGCCATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGGTGGAGCGGATTTCTCCATCGTGGAAACA GAGACTAGAGGCTTTGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGTGG CATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCTTGTCTCAGAACTGTGG GATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCCAAAGCTACTGAACCA GTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCCACTGGTGGCTATCATCGGCAGCAGG AACTCAAGGATGGGGTCATCAAGCTCCGTTCACTGACGAGCAGGGAAGAGGTGGAT GTCCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAAAGGAGAACAGGCCAGCCCTCTG CATCTGCTGA | |
| HisRS1 ^{c7} | Белок/ Человек/ 1-100+ 175-509 | MAERAALVELLVKLQGERVRLKQKASAELEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVL KTPFKGTRDYSRQMAVREKVFVDVIRCFKRHGAVIDTPVFELKDFDIAGNFDPMI PDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLD KVSWEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEG LGDLKLLFEYLTFLFGIDDKISFDLSLARGLDYITGVIEAVLLQTPAQAGEEPLGV GSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTETQ VLVASAQKKLLEERLKLVLSELWDAGIKAEELLYKNPKLNQLQYCEEAGIPLVAII GEQELKDGVIKLSVTSREEVDVRRREDLVEEIKRRTGQPLCIC | SEQ ID NO: 58 |
| HisRS1 ^{c7} | ДНК/Человек | ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCG AGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAAC TCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTC AAAACCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCCGGCAGATGGCAGTTCGCGAGAA GGTGTTTGACGTAATCATCCGTTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAGAAGTCAATTGATA CACCTGTATTTGAACTAAAGGATTTTGACATTGCTGGGAACCTTGATCCCATGATC CCTGATGCAGAGTGCCTGAAGATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCACTTCAGATAGG CGACTTCCTGGTCAAGGTAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGTTTGTCTATCT GTGGTGTCTTGACAGCAAGTTCGGTACCATCTGCTCCTCAGTAGACAAGCTGGAC AAGGTGTCTGGGAAGAGGTGAAGAATGAGATGGTGGGAGAGAAGGGCCTTGCAAC TGAGGTGGCTGACCGCATTGGGGACTATGTCCAGCAACATGGTGGGGTATCCCTGG TGGAACAGCTGCTCCAGGATCCTAACTATCCCAAAACAAGCAGGCCTTGGAGGGC CTGGGAGACCTGAAGTTGCTCTTTGAGTACCTGACCCATATTTGGCATTGATGACAA AATCTCCTTTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTACACTGGGGTGATCT ATGAGGCAGTGTGCTACAGACCCAGCCAGGCAGGGGAAGAGCCCTGGGTGTG GGCAGTGTGGCTGCTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGGCATGTTGACCCCAA AGGGCGCAAGGTGCCATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGGTGGAGCGGATTTTCTCCA TCGTGGAACAGAGACTAGAGGCTTTGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAG GTGCTTGTGGCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCTTGTCTC AGAAGTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCCAAAGC TACTGAACCAAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCCACTGGTGGCTATCATC GGCGAGCAGGAACCAAGGATGGGGTCATCAAGCTCCGTTCACTGACGAGCAGGGA AGAGGTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAAAGGAGAACAGGCC AGCCCTCTGCATCTGCTGA | SEQ ID NO: 59 |

| | | | |
|-----------------------|---|---|------------------|
| HisRS1 ^{c8} | Белок/ Человек/ 1-60+399-509 | MAERAAL EELVKLQGERVRLKQKASAE LIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVL KTPKALEEKIRTTETQVLVSAQKKLLEERLKLVLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPL CIC | SEQ ID NO: 60 |
| HisRS1 ^{c8} | ДНК/Человек | ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCG AGGCCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAAC TCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTC AAAACCCCCAAGGCTTTGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGT GGCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCTTGTCTCAGAACTGT GGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCCTCAAGCTACTGAAC CAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCCACTGGTGGCTATCATCGGCGAGCA GGAAGTCAAGGATGGGGTCATCAAGCTCCGTTCAGTGACGAGCAGGGAAGAGGTGG ATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAAAGGAGAACAGGCCAGCCCTC TGCATCTGCTGA | SEQ ID NO: 61 |
| HisRS1 ^{c9} | Белок/ Человек/ 1-100+399- 509 | MAERAAL EELVKLQGERVRLKQKASAE LIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVL KTPKGRDYSRQMAVREKVFVDVI IRCFKRHGAVIDTPVFELKALEEKIRTTETQ VLVSAQKKLLEERLKLVLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAII GEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC | SEQ ID NO: 62 |
| HisRS1 ^{c9} | ДНК/Человек | ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCG AGGCCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAAC TCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTC AAAACCCCCAAGGCGACAAGAGACTATAGTCCCCGGCAGATGGCAGTTCCGCGAGAA GGTGTTTGACGTAATCATCCGTTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAGAAGTCATTGATA | SEQ ID NO: 63 |
| | | CACCTGTATTTGAACTAAAGGCTTTGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAG GTGCTTGTGGCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCTTGTCTC AGAACTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCCTAAAGC TACTGAACCAAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCCACTGGTGGCTATCATC GGCGAGCAGGAACTCAAGGATGGGGTCATCAAGCTCCGTTCAGTGACGAGCAGGGA AGAGGTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAAAGGAGAACAGGCC AGCCCTCTGCATCTGCTGA | |
| HisRS1 ^{c10} | Белок/ Человек/ 369-509 | MFDPKGRKVPVGLSIGVERIF SIVEQRLEALEEKIRTTETQVLVSAQKKLLEER LKLVLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIIGEQLKDGVIKLR VTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC | SEQ ID NO: 64 |
| HisRS1 ^{c10} | ДНК/Человек | ATGTTGACCCCAAAGGGCGCAAGGTGCCATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGGTGGA GCGGATTTTCTCCATCGTGGAACAGAGACTAGAGGCTTTGGAGGAGAAGATACGGA CCACGGAGACACAGGTGCTTGTGGCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGA CTAAAGCTTGTCTCAGAACTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAA GAAGAACCCAAAGCTACTGAACAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCAC TGGTGGCTATCATCGGCGAGCAGGAACTCAAGGATGGGGTCATCAAGCTCCGTTCA GTGACGAGCAGGGAAGAGGTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAA AAGGAGAACAGGCCAGCCCTCTGCATCTGCTGA | SEQ ID NO: 65 |

Таблица 5В

Уникальные границы сплайсинга полипептидов AARS

| Название | Тип/ вид | Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот в области уникальной границы сплайсинга | SEQ ID NO: |
|----------|-------------------|--|---------------|
| H1-AS01 | ДНК/ Человек | GAAATTTGTGCTCAAAACCCCCAAG GATTTTGACATTGCTGGGAACCTTG | SEQ ID NO: 66 |
| | Белок/ Человек | KFVLKTPKDFDIAGNF | SEQ ID NO: 67 |
| H1-AS02 | ДНК/ Человек | GAAATTTGTGCTCAAAACCCCCAAG GTAAACGATCGACGCATTCTAGATG | SEQ ID NO: 68 |
| | Белок/ Человек | KFVLKTPKVNDRRILD | SEQ ID NO: 69 |
| H1-AS03 | ДНК/ Человек | TGATACACCTGTATTTGAACTAAAG GTAAACGATCGACGCATTCTAGATG | SEQ ID NO: 70 |
| | Белок/ Человек | DTPVFELKVNDRRILD | SEQ ID NO: 71 |
| H1-AS07 | ДНК/ Человек | CCGATACCGGGAATTCTACAGTGT GTAAACGATCGACGCATTCTAGATG | SEQ ID NO: 72 |
| | Белок/ Человек | RYREFYQCVNDRILD | SEQ ID NO: 73 |
| H1-SV04 | ДНК/ Человек | GAAATTTGTGCTCAAAACCCCCAAG GAAACACTGATGGGAAAGTATGGGG | SEQ ID NO: 74 |
| | Белок/ Человек | KFVLKTPKETLMGKYG | SEQ ID NO: 75 |
| H1-SV10 | ДНК/ Человек | TGATACACCTGTATTTGAACTAAAG GATTTTGACATTGCTGGGAACCTTG | SEQ ID NO: 76 |
| | Белок/ Человек | DTPVFELKDFDIAGNF | SEQ ID NO: 77 |
| H1-SV11 | ДНК/ Человек | GAAATTTGTGCTCAAAACCCCCAAG GCTTTGGAGGAGAAGATACGGACCA | SEQ ID NO: 78 |
| | Белок/ Человек | KFVLKTPKALEEKIRT | SEQ ID NO: 79 |
| H1-SV14 | ДНК/ Человек | TGATACACCTGTATTTGAACTAAAG GCTTTGGAGGAGAAGATACGGACCA | SEQ ID NO: 80 |
| | Белок/ Человек | DTPVFELKALEEKIRT | SEQ ID NO: 81 |
| H1-AS05 | ДНК/ Человек | CTCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAG GTGGGGTATCCCTGGTGGAACAGCT | SEQ ID NO: 82 |
| | Белок/ Человек | N/A | |

Таблица 6

Полипептиды и нуклеиновые кислоты AARS, идентифицированные с помощью биоинформатики

| Название | Тип/ вид/остатки | Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот | SEQ ID NO: |
|----------------------|-------------------------------|---|------------------|
| HisRS1 ^{C1} | Белок/ Человек/ 405-509 | RTTETQVLVASAQKLLLEERLKLVSLEWDAGIKAEELLYKKNPKLLNLQYCEEAGIP LVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC | SEQ ID NO: 83 |
| HisRS1 ^{C1} | ДНК/ Человек/ | CGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGTGGCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAA AGACTAAAGCTTGTCTCAGAACTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTAC AAGAAGAACCCAAAGCTACTGAACAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCCA CTGGTGGCTATCATCGGCAGCAGGAACCTCAAGGATGGG GTCATCAAGCTCCGTTCACTGACGAGCAGGGAAGAGGTGGATGTCCGAAGAGAAGAC CTTGTGGAGGAAATCAAAGGAGAACAGGCCAGCCCTCTGCATCTGCTGA | SEQ ID NO: 84 |

Внутренние полипептиды AARS: (табл. 7, 8 и 9).

Таблица 7A

Полипептиды AARS, идентифицированные с помощью MC

| Название | Тип/ вид/Остатки | Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот | SEQ ID NO: |
|----------|---------------------|---|------------|
|----------|---------------------|---|------------|

Таблица 7B

Выявленные с помощью масс-спектрометрии пептиды AspRS1¹¹ и предполагаемые связывающие пептиды

| Тип/вид | Последовательность | SEQ ID NO: |
|---------|--------------------|------------|
|---------|--------------------|------------|

Таблица 7C

Составленные последовательности на основе выявленных с помощью масс-спектрометрии пептидов

| Тип/вид | Последовательность | SEQ ID NO: |
|---------|--------------------|------------|
|---------|--------------------|------------|

Таблица 8A

Полипептиды AARS и альтернативные транскрипты, идентифицированные методом глубокого секвенирования

| Название | Тип/ вид/Остатки | Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот | SEQ ID NO: |
|----------|---------------------|---|------------|
|----------|---------------------|---|------------|

Таблица 8B

Уникальные границы сплайсинга полипептидов AARS

| Название | Тип/ вид | Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот в области уникальной границы сплайсинга | SEQ ID NO: |
|----------|-------------|---|------------|
|----------|-------------|---|------------|

Таблица 9

Полипептиды и нуклеиновые кислоты AARS, идентифицированные с помощью биоинформатики

| Название | Тип/вид/ Остатки | Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот | SEQ ID NO: |
|----------------------|-------------------------------|---|----------------|
| HisRS1 ¹¹ | Белок/ Человек/ 191-333 | CLKIMCEILSSQLIGDFLVKVNDRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTG | SEQ ID NO: 109 |
| HisRS1 ¹¹ | ДНК/Человек | TGCCTGAAGATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCAGATAGGCGACTTCTCGTCAAGGTAACGATCGACGATTCAGATGGGATGTTGCTATCTGTGGTGTCTGACAGCAAGTTCGATACCATCTGCTCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAGGTGCTCTGGGAAGAGGTGAAGAATGAGATGGTGGGAGAGAAGGGCCTTGACCTGAGGTGGCTGACCGCATGGGGACTATGTCCAGCAACATGGTGGGGTATCCCTGGTGAACAGCTGTCCAGGATCCTAACTATCCCAAAACAAGCAGGCCTTGGAGGGCCTGGGAGACCTGAAGTTGCTCTTTGAGTACCTGACCCATTTGGCATGTATGACAAAATCTCCTTTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTACACTGGG | SEQ ID NO: 110 |

"Белковые фрагменты" или аминокислотные последовательности белковых фрагментов, такие как протеолитические фрагменты или фрагменты вариантов сплайсинга, могут быть охарактеризованы, идентифицированы или получены в соответствии с различными методами. Например, варианты сплайсинга могут быть идентифицированы с помощью таких методов, как глубокое секвенирование (см., например, Xing et al., RNA. 14:1470-1479, 2008; и Zhang et al., Genome Research. 17:503-509, 2007). В качестве другого примера, белковые фрагменты, такие как протеолитические фрагменты, могут быть идентифицированы *in vitro*, например, посредством инкубации полноразмерных или других полипептидов AARS с выбранными протеазами, или они могут быть идентифицированы эндогенно (например, *in vivo*). Согласно конкретным вариантам реализации изобретения белковые фрагменты, такие как эндогенные протеолитические фрагменты, могут быть созданы или идентифицированы, например, путем рекомбинантной экспрессии полноразмерных или других полипептидов AARS в выбранном микроорганизме или эукариотической клетке, который либо был модифицирован для включения одной или более выбранных протеаз, либо естественным образом содержит одну или более протеаз, которые способны действовать на выбранный полипептид AARS, и изолирования и характеристики эндогенно продуцированных его белковых фрагментов.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения белковые фрагменты, такие как эндогенные (например, природные) протеолитические фрагменты, могут быть созданы или идентифицированы, например, в различных клеточных фракциях (например, цитозольной, мембранной, ядерной) и/или ростовой среде различных клеточных типов, включая, например, иммунные клетки, такие как моноциты, дендритные клетки, макрофаги (например, макрофаги RAW 264,7), нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и лимфоциты, такие как В-клетки и Т-клетки (например, CD4+ хелперные и CD8+ киллерные клетки), включая первичные Т-клетки и Т-клеточные линии, такие как Т-клетки Jurkat, также как и естественные

киллеры (natural killer, NK-клетки).

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения белковые фрагменты, такие как эндогенные протеолитические фрагменты, полученные любым способом, могут быть идентифицированы с помощью методов, таких как масс-спектрометрия или эквивалентные методы. После получения *in vitro* или идентификации эндогенно идентифицированного белкового фрагмента, его можно картировать или секвенировать и, например, клонировать в векторе экспрессии для рекомбинантной продукции или получать синтетическим путем.

Широкое разнообразие протеаз может использоваться для продукции, идентификации, изолирования или исследования последовательности белковых фрагментов AARS, таких как протеолитические фрагменты. В целом протеазы обычно классифицируют по трем основным критериям: (i) катализируемая реакция, (ii) химическая природа каталитического сайта и (iii) эволюционные отношения, выявленные на основе структуры. Общие примеры протеаз или протеиназ при классификации по механизму катализа включают аспарагиновые протеазы, сериновые протеазы, цистеиновые протеазы и металлопротеазы.

Большинство аспарагиновых протеаз принадлежат к семейству пепсинов. Указанное семейство включает пищеварительные ферменты, такие как пепсин и химозин, также как и лизосомальные катепсины D и ферменты процессинга, такие как ренин, и ключевые грибковые протеазы (например, пенициллопепсин, ризопуспепсин, эндотиапепсин). Второе семейство аспарагиновых протеаз включает вирусные протеазы, такие как протеаза из вируса СПИДа (HIV), также называемая ретропепсином.

Сериновые протеазы включают два отдельных семейства. Первое семейство химотрипсинов, которое включает ферменты млекопитающих, такие как химотрипсин, трипсин, эластазу и калликреин, и второе семейство субтилизинов, которое включает бактериальные ферменты, такие как субтилизин. Общая трехмерная структура различается между указанными двумя классами, но они имеют одинаковую геометрию активного сайта, и катализ проходит по одинаковому механизму. Сериновые протеазы проявляют разную субстратную специфичность, что связано, главным образом с аминокислотными заменами в различных субсайтах фермента (сайтах взаимодействия с остатком субстрата). Некоторые сериновые протеазы имеют расширенный сайт взаимодействия с субстратом, тогда как другие имеют специфичность, которая ограничивается остатком субстрата P1.

Семейство цистеиновых протеаз включает протеазы растений, такие как папаин, актинидии и бромелаин, некоторые лизосомальные катепсины млекопитающих, цитозольные кальпаины (кальций-активируемые), также как и некоторые протеазы паразитов (например, *Trypanosoma*, *Schistosoma*). Папаин представляет собой архетипичный и наиболее изученный член семейства. Недавнее раскрытие рентгеновской структуры превращающего интерлейкин-1-бета фермента выявило новый тип укладки цистеиновых протеиназ.

Металлопротеазы являются одним из наиболее древних классов протеаз, обнаруженных в бактериях, грибах и высших организмах. Они значительно различаются по их последовательностям и трехмерным структурам, но значительное большинство ферментов содержит атом цинка, который является каталитически активным. В некоторых случаях, цинк может быть замещен другим металлом, таким как кобальт или никель, без потери протеолитической активности. Бактериальный термолизин был хорошо охарактеризован и его кристаллографическая структура указывает на то, что цинк связан двумя гистидинами и одной глутаминовой кислотой. Многие металлопротеазы содержат мотив последовательности HEXXH, который обеспечивает два гистидиновых лиганда для цинка. Третий лиганд либо представляет собой глутаминовую кислоту (термолизин, неприлизин, аланиламинопептидаза), либо гистидин (астацин, серрализин).

Типичные протеазы включают, например, ахромопептидазу, аминопептидазу, анкрод, ангиотензин-превращающий фермент, бромелаин, кальпаин, кальпаин I, кальпаин II, карбоксипептидазу A, карбоксипептидазу B, карбоксипептидазу G, карбоксипептидазу P, карбоксипептидазу W, карбоксипептидазу Y, каспазу 1, каспазу 2, каспазу 3, каспазу 4, каспазу 5, каспазу 6, каспазу 7, каспазу 8, каспазу 9, каспазу 10, каспазу 11, каспазу 12, каспазу 13, катепсин B, катепсин C, катепсин D, катепсин E, катепсин G, катепсин H, катепсин L, химопапаин, химазу, химотрипсин, кластрипаин, коллагеназу, компонент комплемента C1r, компонент комплемента C1s, фактор комплемента D, фактор комплемента I, кукумизин, дипептидилпептидазу IV, эластазу (лейкоцитарную), эластазу (панкреатическую), эндопротеиназу Arg-C, эндопротеиназу Asp-N, эндопротеиназу Glu-C, эндопротеиназу Lys-C, энтерокиназу, фактор Ха, фицин, фузин, гранзим A, гранзим B, протеазу ВИЧ, IGa3у, тканевой калликреин, лейциновую аминопептидазу (общую), лейциновую аминопептидазу (цитозольную), лейциновую аминопептидазу (микросомальную), матриксную металлопротеазу, метиониновую аминопептидазу, нейтразу, папаин, пепсин, плазмин, пролидазу, проназу E, простатоспецифический антиген, алкалофильную протеазу из *Streptomyces griseus*, протеазу из *Aspergillus*, протеазу из *Aspergillus saitoi*, протеазу из *Aspergillus sojae*, протеазу (*B. licheniformis*) (щелочную, или алкалазу), протеазу из *Bacillus polymyxa*, протеазу из *Bacillus sp.*, протеазу из *Rhizopus sp.*, протеазу S, пртеасомы, протеиназу из *Aspergillus oryzae*, протеиназу 3, протеиназу A, протеиназу K, протеин C, пироглутаматаминопептидазу, ренин, стрептокиназу, субтилизин, термолизин, тромбин, тканевой активатор плазминогена, трипсин, триптазу и урокиназу.

Конкретные варианты реализации изобретения относятся к изолированным полипептидам AARS,

содержащим, по существу состоящим из или состоящим из аминокислотных последовательностей, которые являются производными эндогенных природных полипептидных фрагментов AARS, к фармацевтическим композициям, содержащим указанные фрагменты, и способам их применения. Указанные и родственные варианты реализации изобретения могут быть получены или идентифицированы *in vivo*, *ex vivo* и/или *in vitro*. Согласно конкретным предпочтительным вариантам реализации изобретения *in vitro* получают или идентифицируют протеолитические фрагменты AARS путем инкубирования полипептида AARS, такого как полноразмерный полипептид AARS, с одной или более изолированными человеческими протеазами, главным образом, эндогенными для человека или природными протеазами, такими как эластаза и другие, описанные в настоящем изобретении и известные в данной области техники. Другие варианты реализации изобретения относятся к изолированным полипептидам AARS, содержащим, по существу состоящим из или состоящим из аминокислотных последовательностей, которые являются производными эндогенных природных сплайс-вариантов AARS, и фармацевтическим композициям, содержащим указанные фрагменты, и способам их применения. По существу, белковый фрагмент AARS может быть изолирован из образцов, которые подвергали действию протеаз, *in vivo* или *in vitro*.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения белковые фрагменты AARS могут быть идентифицированы с помощью методов, таких как масс-спектрометрия или эквивалентные методы. Исключительно в качестве иллюстрации, но не ограничения, согласно конкретным вариантам реализации изобретения тотальные белки из различных типов клеток, тканей или жидкостей организма в различных физиологических состояниях (например, гипоксия, диета, возраст, заболевание) или их фракции могут быть разделены с помощью одномерного электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, и гелевые дорожки могут быть нарезаны на полосы с фиксированными интервалами; после чего указанные полосы могут быть необязательно расщеплены соответствующей протеазой, такой как трипсин, для высвобождения пептидов, которые затем можно анализировать с помощью одномерной обращеннофазовой ЖХ/МС/МС. Полученные данные протеомного анализа можно вводить в так называемые пептографы, которые наносят на график, в левой панели, частоту встречаемости последовательности для конкретного белка в горизонтальном направлении (от N-конца к С-концу, слева направо) в зависимости от перемещения в процессе электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в вертикальном направлении (от больших к маленьким молекулярным массам, сверху вниз). Конкретные пептидные фрагменты могут затем быть секвенированы или картированы. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения эталонный фрагмент AARS может характеризоваться уникальной молекулярной массой, по сравнению, например, с молекулярной массой соответствующего полноразмерного AARS.

Как отмечено выше, варианты реализации настоящего изобретения включают полипептиды AARS, представленные в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9. Также включены "варианты" эталонных полипептидов AARS. Термин "вариант" полипептида относится к полипептидам, которые отличаются от эталонного полипептида AARS в результате добавления, делеции и/или замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка, и которые, как правило, сохраняют (например, имитируют) или модулируют (например, проявляют антагонизм) один или более видов неканонической активности эталонного полипептида AARS.

Кроме того, человеческие гистидил-тРНК-синтетазы включают несколько сотен высоко родственных полиморфных форм и указанные формы, как известно в данной области техники, являются, по меньшей мере, частично функционально взаимозаменяемыми. Таким образом, выбор природного варианта гистидил-тРНК-синтетазы является обычной задачей, включая, например, однонуклеотидные полиморфные формы, перечисленные в табл. А, для создания полипептида AARS, содержащего одно или более аминокислотных изменений, на основе последовательности любого из гомологов, ортологов и природных изоформ человека, также как и других видов гистидил-тРНК-синтетазы.

Таблица А

Однонуклеотидные полиморфные формы (SNP) человеческих гистидил-тРНК-синтетаз

| Код доступа GeneBank | Замена нуклеотида |
|----------------------|-------------------|
| rs78741041 | G/T |
| rs34790864 | C/G |
| rs34732372 | C/T |
| rs11548125 | A/G |
| rs11548124 | C/G |

| | |
|------------|-----------------------|
| rs2230361 | C/T |
| rs1131046 | C/T |
| rs1131045 | C/G |
| rs1131044 | C/T |
| rs1131043 | C/G |
| rs1131042 | A/C |
| rs1131041 | C/G |
| rs1131040 | A/G |
| rs1131039 | C/T |
| rs1131038 | A/G |
| rs1131037 | A/G |
| rs1131036 | A/G |
| rs1131035 | C/T |
| rs1131034 | A/G |
| rs1131033 | A/G |
| rs1131032 | A/G |
| rs1050252 | C/T |
| rs1050251 | A/T |
| rs1050250 | A/G |
| rs1050249 | C/T |
| rs1050248 | A/T |
| rs1050247 | C/T |
| rs1050246 | C/G |
| rs1050245 | C/T |
| rs71835204 | (большая делеция) / - |
| rs71766955 | (большая делеция) / - |
| rs71835204 | (большая делеция) / - |
| rs71766955 | (большая делеция) / - |

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения вариант полипептида отличается от эталонного полипептида одной или более заменами, которые могут быть консервативными или не консервативными, как описано в настоящем изобретении и известно в данной области техники. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения вариант полипептида содержит консервативные замены, при этом, совершенно очевидно в данной области техники, что некоторые аминокислоты могут быть заменены на другие, в целом обладающие такими же свойствами, без изменения природы активности полипептида.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения вариантный полипептид содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или более идентичную или подобную по последовательности соответствующей эталонной последовательности полипептида AARS, описанного в настоящем изобретении, и по существу сохраняет неканоническую активность указанного эталонного полипептида. Также включены последовательности, отличающиеся от эталонной последовательности AARS в результате добавления, делеции или замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 или более аминокислот, но сохраняющие свойства эталонного полипептида AARS. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения добавления или делеции аминокислот происходят на С-конце и/или N-конце эталонного полипептида AARS. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения присоединения аминокислот включают 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 или более остатков дикого типа (т.е. от соответствующего полноразмерного полипептида AARS), которые являются наиболее приближенными к С-концу и/или N-концу эталонного полипептида AARS.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения варианты полипептиды отличаются от соответствующей эталонной последовательности AARS по меньшей мере на 1%, но менее чем на 20, 15, 10 или 5% по остаткам. (Если указанное сравнение требует выравнивания, то последовательности следует выравнивать с обеспечением максимального подобия. "Выпущенные" последовательности в результате делеции или вставки или несовпадений считаются различиями). Различия предпочтительно представляют собой различия или изменения в заменимых остатках или консервативную замену. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения молекулярная масса варианта полипептида AARS отличается от молекулярной массы эталонного полипептида AARS примерно на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20% или более.

Также предложены биологически активные "фрагменты" эталонных полипептидов AARS, т.е. биологически активные фрагменты белковых фрагментов AARS. Типичные биологически активные фрагменты в целом принимают участие во взаимодействии, например, внутримолекулярном или межмолекулярном взаимодействии. Межмолекулярное взаимодействие может представлять собой специфическое связывание или ферментативное взаимодействие. Межмолекулярное взаимодействие может представлять собой взаимодействие между полипептидом AARS и клеточным партнером по связыванию, таким как клеточный рецептор или другие хозяйские молекулы, которые принимают участие в неканонической активности полипептида AARS. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения белки AARS, их варианты и биологически активные фрагменты, связываются с одним или более клеточными партнерами связывания с аффинностью, составляющей по меньшей мере примерно 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40 или 50 нМ. Аффинность связывания белкового фрагмента AARS с выбранным клеточным партнером по связыванию, в частности, партнером по связыванию, который принимает участие в неканонической активности, как правило, сильнее, чем аффинность белкового фрагмента AARS к соответствующему полноразмерному полипептиду AARS по меньшей мере примерно в 1,5х, 2х, 2,5х, 3х, 3,5х, 4х, 4,5х, 5х, 6х, 7х, 8х, 9х, 10х, 15х, 20х, 25х, 30х, 40х, 50х, 60х, 70х, 80х, 90х, 100х, 200х, 300х, 400х, 500х, 600х, 700х, 800х, 900х, 1000х или более раз (включая все целые числа между указанными). Аффинность связывания белкового фрагмента AARS с партнером по связыванию, который принимает участие по меньшей мере в одной традиционной активности AARS, как правило, меньше аффинности указанного белкового фрагмента AARS к соответствующему полноразмерному полипептиду AARS по меньшей мере примерно в 1,5х, 2х, 2,5х, 3х, 3,5х, 4х, 4,5х, 5х, 6х, 7х, 8х, 9х, 10х, 15х, 20х, 25х, 30х, 40х, 50х, 60х, 70х, 80х, 90х, 100х, 200х, 300х, 400х, 500х, 600х, 700х, 800х, 900х, 1000х или более раз.

Как правило, биологически активные фрагменты включают домен или мотив, обладающий по меньшей мере одной активностью эталонного полипептида AARS, и могут включать один или более (и в некоторых случаях все) из различных активных доменов и включают фрагменты, обладающие неканонической активностью. В некоторых случаях, биологически активные фрагменты полипептида AARS обладают биологической активностью, которая является уникальной для конкретного укороченного фрагмента, при этом полноразмерный полипептид AARS может не обладать указанной активностью. В конкретных случаях, биологическая активность может быть раскрыта путем отделения биологически активного фрагмента полипептида AARS от других последовательностей полноразмерного полипептида AARS или путем изменения конкретных остатков последовательности полноразмерного полипептида AARS дикого типа для открытия биологически активных доменов.

Биологически активный фрагмент эталонного полипептида AARS может представлять собой полипептидный фрагмент, который состоит, например, из 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750 или более заменимых или незаменимых аминокислот, включая все целые числа (например, 101, 102, 103) и диапазоны (например, 50-100, 50-150, 50-200) между ними, аминокислотных последовательностей, описанных для любого из эталонных полипептидов AARS, описанных в настоящем изобретении, но, как правило, за исключением полноразмерной AARS. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения биологически активный фрагмент содержит связанную с неканонической активностью последовательность, домен или мотив. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения С-концевой или N-концевой участок любого эталонного полипептида AARS может быть укорочен примерно на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 или 700 или более аминокислот или примерно на 10-50, 20-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550, 550-600, 600-650, 650-700 или более аминокислот, включая все целые числа и диапазоны между ними (например, 101, 102, 103, 104, 105), при условии, что укороченный полипептид AARS сохраняет неканоническую активность эталонного полипептида. Как правило, биологически активный фрагмент обладает не меньше примерно 1%, примерно 5%, примерно 10%, примерно 25% или примерно 50% активности (т.е. неканонической активности) биологически активного эталонного полипептида AARS, из которого он произошел. Примеры способов оценки указанных неканонических видов активности описаны в примерах.

Как отмечено выше, полипептид AARS может быть изменен различными путями, включая аминокислотные замены, делеции, усечения и вставки. Методы таких манипуляций в целом известны в данной области техники. Например, варианты аминокислотных последовательностей эталонного полипептида AARS могут быть получены путем введения мутаций в ДНК. Способы мутагенеза и изменения нуклеотидной последовательности хорошо известны в данной области техники. См., например, Kunkel (1985, Proc. Natl. Acad. Sci. США. 82: 488-492), Kunkel et al. (1987, Methods in Enzymol, 154: 367-382), патент US № 4873192, Watson, J.D. et al. ("Molecular Biology of the Gene", Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) и цитированные в указанных источниках ссылки. Руководство по внесению соответствующих замен аминокислот, не влияющих на биологическую активность интересующего белка, может

быть найдено в модели Дэйхоффа (Dayhoff et al. (1978), Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C)).

Аналогично, специалистам в данной области техники очевидно, как устранять и/или ослаблять проблему иммуногенности при ее возникновении при использовании полипептида AARS, например, путем применения автоматизированных программ компьютерного распознавания для идентификации потенциальных эпитопов Т-клеток и методов направленной разработки для идентификации менее иммуногенных форм.

Способы скрининга генных продуктов комбинаторных библиотек, созданных с помощью точечных мутаций или усечений и скрининга библиотеки кДНК на предмет генных продуктов, имеющих выбранное свойство, известны в данной области техники. Указанные способы можно адаптировать для быстрого скрининга генной библиотеки, созданной с помощью комбинаторного мутагенеза полипептидов AARS. Рекурсивный множественный мутагенез (REM), метод, который усиливает частоту возникновения функциональных мутантов в библиотеке, может применяться в комбинации со скрининговыми анализами для идентификации вариантов полипептида AARS (Arkin and Yourvan (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. США 89: 7811-7815; Delgrave et al. (1993), Protein Engineering, 6: 327-331). Консервативные замены, такие как замена одной аминокислоты на другую, имеющую сходные свойства, может являться желательным, как обсуждается более подробно ниже.

Биологически активные укороченные и/или вариантные полипептиды AARS могут содержать консервативные аминокислотные замены в различных положениях в их последовательности по сравнению с эталонным остатком аминокислоты AARS. Кроме того, природные варианты белков AARS были секвенированы, и как известно в данной области техники, являются, по меньшей мере, частично функционально взаимозаменяемыми. Таким образом, выбор положения аминокислот для введения консервативной или неконсервативной мутации в полипептид AARS на основании вариации природных последовательностей среди известных гомологов, ортологов и природных изоформ белков AARS человека, а также других видов белка AARS, является стандартной практикой.

"Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, в которой аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, имеющий сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, определены в данной области техники, и в целом могут быть разделены на подклассы следующим образом.

Кислые: остаток имеет отрицательный заряд из-за потери иона H при физиологических значениях pH, и указанный остаток притягивается водным раствором таким образом, что поверхностные положения спрятаны внутри конформации пептида, в котором он содержится, когда указанный пептид находится в водной среде при физиологических значениях pH. Аминокислоты, содержащие кислые боковые цепи, включают глутаминовую кислоту и аспарагиновую кислоту.

Основные: остаток имеет положительный заряд из-за ассоциации с ионом H при физиологических значениях pH или в пределах одной или двух единиц от физиологического значения pH (например, гистидин) и остаток притягивается водным раствором таким образом, что поверхностные положения спрятаны внутри конформации пептида, в котором он содержится, когда указанный пептид находится в водной среде при физиологических значениях pH. Аминокислоты, имеющие основную боковую цепь, включают аргинин, лизин и гистидин.

Заряженные: остатки являются заряженными при физиологических значениях pH и, соответственно, включают аминокислоты, содержащие кислые или основные боковые цепи (т.е. глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, аргинин, лизин и гистидин).

Гидрофобные: остатки являются незаряженными при физиологических значениях pH и остаток отталкивается водным раствором таким образом, что внутренние положения спрятаны внутри конформации пептида, в которой он находится в водной среде. Аминокислоты, имеющие гидрофобную боковую цепь, включают тирозин, валин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин и триптофан.

Нейтральные/полярные: остатки не заряжены при физиологических значениях pH, но остаток недостаточно отталкивается водным раствором, таким образом, что внутренние положения спрятаны внутри конформации пептида, в которой он находится в водной среде. Аминокислоты, содержащие нейтральную/полярную боковую цепь включают аспарагин, глутамин, цистеин, гистидин, серин и треонин.

Настоящее описание также характеризует конкретные аминокислоты как "малые", если их боковые цепи не достаточно большие, даже в отсутствие полярных групп, для обеспечения гидрофобности. За исключением пролина, "малые" аминокислоты представляют собой аминокислоты, содержащие четыре атома углерода, или менее, если по меньшей мере одна полярная группа находится на боковой цепи, и три атома углерода, или менее, если нет. Аминокислоты, содержащие малую боковую цепочку, включают глицин, серин, аланин и треонин. Кодированная генами вторичная аминокислота пролин представляет собой исключение из-за ее известного влияния на вторичную конформацию пептидных цепей. Структура пролина отличается от всех других природных аминокислот тем, что его боковая цепочка связана с атомом азота α -аминогруппы, также как и α -углеродом. Несколько матриц подобия аминокислот известно в данной области техники (см., например, матрицу PAM120 и матрицу PAM250, описанную, например, Дэйхоффом, Dayhoff et al., 1978, A model of evolutionary change in proteins). Однако матрицы для

определения отношений расстояния, описанные в источнике M. O. Dayhoff, (ed.), Atlas of protein sequence and structure, Vol. 5, p. 345-358, National Biomedical Research Foundation, Washington DC; и Gonnet et al. (Science, 256: 14430-1445, 1992), включают пролин в той же группе, что и глицин, серин, аланин и треонин. Соответственно, в целях настоящего изобретения, пролин классифицируют как "малую" аминокислоту.

Степень притяжения или отталкивания, необходимая для отнесения аминокислот к классу полярных или неполярных, является неоднозначной и, соответственно, аминокислоты, которые конкретно рассматриваются согласно изобретению, были классифицированы как полярные или неполярные. Большинство аминокислот, которые не имеют конкретного названия, могут быть классифицированы на основе известного поведения.

Аминокислотные остатки могут быть также разделены на подклассы как циклические или нециклические и ароматические или неароматические (очевидные классификации на основе групп-заместителей боковых цепей остатков) и как маленькие или большие. Остаток считается маленьким, если он содержит в общем четыре атома углерода, или менее, включая атом углерода карбоксила, при условии что присутствует дополнительный полярный заместитель; в противном случае - три, или менее. Маленькие остатки, безусловно, всегда являются неароматическими. В зависимости от их структурных свойств, аминокислотные остатки могут входить в состав двух или более классов. Для аминокислот природных белков разделение на подклассы в соответствии с указанной схемой показано в табл. В.

Таблица В

| Подклассы аминокислот | |
|--------------------------------------|---|
| Подклассы | Аминокислоты |
| Кислые | Аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота |
| Основные | Нециклические: аргинин, лизин; Циклические: гистидин |
| Заряженные | Аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин, лизин, гистидин |
| Малые | Глицин, серин, аланин, треонин, пролин |
| Полярные/нейтральные | Аспарагин, гистидин, глутамин, цистеин, серин, треонин |
| Полярные/большие | Аспарагин, глутамин |
| Гидрофобные | тирозин, валин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, триптофан |
| Ароматические | Триптофан, тирозин, фенилаланин |
| Остатки, влияющие на ориентацию цепи | Глицин и пролин |

Консервативная замена аминокислот также включает образование групп на основе боковых цепей. Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, включает глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; группа аминокислот, имеющих алифатические гидроксильные боковые цепи, включает серин и треонин; группа аминокислот, содержащих амидные боковые цепи, включает аспарагин и глутамин; группа аминокислот, содержащих ароматические боковые цепи, включает фенилаланин, тирозин и триптофан; группа аминокислот, содержащих основные боковые цепи, включает лизин, аргинин и гистидин; и группа аминокислот, содержащих боковые цепи, включающие серу, представляет собой цистеин и метионин. Например, имеются основания ожидать, что замещение лейцина изолейцином или валином, аспартата глутаматом, треонина серином или подобное замещение аминокислоты структурно родственной аминокислотой не будет оказывать значительное влияние на свойства полученного в результате варианта полипептида. Приводит ли изменение аминокислот к образованию функционально укороченного и/или вариантного полипептида AARS, можно с легкостью определить путем анализа его неканонической активности, как описано в настоящем изобретении. Консервативные замены показаны в табл. С под заголовком "Примеры замен". Аминокислотные замены в пределах объема изобретения в целом осуществляются путем выбора замен, которые значительно не отличаются по их влиянию на поддержание (а) структуры скелета пептида в области замены, (b) заряда или гидрофобности молекулы в области-мишени, (c) объема боковой цепи или (d) биологической функции. После введения замен варианты подвергали скринингу на предмет биологической активности.

Таблица С

Примеры аминокислотных замен

| Исходный остаток | Примеры замен | Предпочтительные замены |
|------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Ala | Val, Leu, Ile | Val |
| Arg | Lys, Gln, Asn | Lys |
| Asn | Gln, His, Lys, Arg | Gln |
| Asp | Glu | Glu |
| Cys | Ser | Ser |
| Gln | Asn, His, Lys, | Asn |
| Glu | Asp, Lys | Asp |
| Gly | Pro | Pro |
| His | Asn, Gln, Lys, Arg | Arg |
| Ile | Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleu | Leu |
| Leu | Norleu, Ile, Val, Met, Ala, Phe | Ile |
| Lys | Arg, Gln, Asn | Arg |
| Met | Leu, Ile, Phe | Leu |
| Phe | Leu, Val, Ile, Ala | Leu |
| Pro | Gly | Gly |
| Ser | Thr | Thr |
| Thr | Ser | Ser |
| Trp | Tyr | Tyr |
| Tyr | Trp, Phe, Thr, Ser | Phe |
| Val | Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleu | Leu |

В альтернативном варианте подобные аминокислоты для создания консервативных замен могут быть разделены на три категории на основе идентичности боковых цепей. Первая группа включает глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, аргинин, лизин, гистидин, все из которых имеют заряженные боковые цепи; вторая группа включает глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, глутамин, аспарагин; и третья группа включает лейцин, изолейцин, валин, аланин, пролин, фенилаланин, триптофан, метионин, как описано в источнике Zubay, G., Biochemistry, third edition, Wm. C. Brown Publishers (1993).

Таким образом, предсказанные заменимые аминокислотные остатки в укороченном и/или вариантном полипептиде AARS, как правило, заменяются на другой аминокислотный остаток из того же семейства боковых цепей. В альтернативном варианте могут быть введены случайные мутации по всей или части кодирующей последовательности AARS, например, путем насыщающего мутагенеза, и полученные в результате мутанты могут подвергаться скринингу на предмет видов активности исходного полипептида для идентификации мутантов, которые сохраняют указанные активности. После мутагенеза кодирующей последовательности, закодированный пептид можно экспрессировать рекомбинантным путем и можно определить активности пептида. "Заменимые" аминокислотные остатки представляют собой остатки, которые могут быть измененными по сравнению с эталонной последовательностью полипептида согласно варианту реализации изобретения без устранения или существенного изменения одной или более видов активности. Соответствующее изменение по существу не устраняет один из указанных видов активности, например, активность по меньшей мере составляет 20, 40, 60, 70 или 80, 100, 500, 1000% или более от активности эталонной последовательности AARS. "Незаменимые" аминокислотные остатки представляют собой остатки, изменение которых по сравнению с эталонной последовательностью полипептида AARS приводит к устранению активности исходной молекулы, например, сохраняется менее чем 20% эталонной активности. Например, указанные незаменимые аминокислотные остатки включают остатки, которые являются консервативными в полипептидах AARS у разных видов, включая такие последовательности, которые являются консервативными по активному сайту (сайтам) связывания или мотиву (мотивам) полипептидов AARS из различных источников.

В целом полипептиды и гибридные полипептиды (также как и кодирующие их полинуклеотиды) являются изолированными. "Изолированный" полипептид или полинуклеотид представляет собой полипептид или полинуклеотид, который был выделен из его естественного окружения. Например, природный белок является изолированным, если он отделен от некоторых или всех существующих с ним в естественной системе материалов. Предпочтительно, указанные полипептиды являются по меньшей мере примерно на 90% чистыми, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 95% чистыми и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно на 99% чистыми. Полинуклеотид считается изолированным, если, например, он был клонирован в векторе, который не является частью естественного окружения.

Конкретные варианты реализации изобретения также включают димеры полипептидов AARS. Ди-

меры могут включать, например, гомодимеры между двумя идентичными полипептидами AARS, гетеродимеры между двумя различными полипептидами AARS (например, полноразмерным полипептидом YRS и укороченным полипептидом YRS; укороченным полипептидом YRS и укороченным полипептидом WRS), и/или гетеродимеры между полипептидом AARS и гетерологичным полипептидом. Конкретные гетеродимеры, такие как гетеродимеры между полипептидом AARS и гетерологичным полипептидом, могут являться бифункциональными, как описано в настоящем изобретении.

Также предложены мономеры полипептидов AARS, включая изолированные мономеры полипептидов AARS, которые по существу не димеризуются со вторым полипептидом AARS, вследствие одного или более замещения, усечения, делеции, добавления, химической модификации или комбинации указанных изменений. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения мономерные полипептиды AARS обладают биологическими видами активности, включая неканонические виды активности, которыми не обладают димерные или мультимерные комплексы полипептидов AARS.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения также предложено применение модифицированных полипептидов AARS, включая модификации, улучшающие желательные характеристики полипептида AARS, описанного в настоящем изобретении. Модификации полипептидов AARS согласно изобретению включают химическую и/или ферментативную дериватизацию одной или более составляющих их аминокислот, включая модификации боковой цепи, модификации скелета и модификации N- и C-конца, включая ацетилирование, гидроксילирование, метилирование, амидирование и присоединение углеводных или липидных фрагментов, кофакторов и т.п. Типичные модификации также включают пэгирование полипептида AARS (см., например, Veronese and Harris, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 453-456, 2002; и Pasut et al., *Expert Opinion. Ther. Patents* 14(6) 859-894, 2004, обе включены сюда посредством ссылки).

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) представляет собой хорошо известный полимер, обладающий свойством растворимости в воде и во многих органических растворителях, отсутствием токсичности и отсутствием иммуногенности. Также он является прозрачным, бесцветным, не имеет запаха и является химически стабильным. По этим и другим причинам ПЭГ был выбран в качестве предпочтительного полимера для присоединения и использовался исключительно в целях иллюстрации, а не в качестве ограничения. Подобные продукты могут быть получены при использовании других растворимых в воде полимеров, включая, но не ограничиваясь ими; поливинилспирт, другие поли(алкиленоксиды), такие как поли(пропиленгликоль) и т.п., поли(оксиэтилированные полиолы), такие как поли(оксиэтилированный глицерин) и т.п., карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, этилен/малеиновый ангидрид и полиаминокислоты. Специалисты в данной области техники смогут выбрать желательный полимер на основе желаемой дозы, времени циркуляции, устойчивости к протеолизу и других факторов.

В частности, многочисленные разнообразные производные ПЭГ являются доступными и подходящими для применения в получении ПЭГ-конъюгатов. Например, ПЭГ-реагенты компании NOF Corp.'s, которые продаются под торговой маркой SUNBRIGHT® Series, предлагают множество ПЭГ-производных, включая метоксиполиэтиленгликоли и активированные производные ПЭГ, такие как метокси-ПЭГ амины, малеимиды, сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды и карбоновые кислоты, для сочетания с помощью различных способов с N-концевой, C-концевой или любой внутренней аминокислотой полипептида AARS. Улучшенная технология пэгирования Nektar Therapeutics' также предлагает различные технологии ПЭГ-присоединения для потенциального улучшения безопасности и эффективности терапевтических средств на основе полипептида AARS.

Поиск патентов, опубликованных патентных заявок и родственных заявок также позволит специалистам в данной области техники рассмотреть настоящее изобретение с учетом возможных значительных технологий ПЭГ-сочетания и ПЭГ-производных. Например, патенты США № 6436386; 5932462; 5900461; 5824784 и 4904584, содержание которых полностью включено посредством ссылки, описывают указанные технологии и производные и способы для их получения.

Согласно конкретным аспектам изобретения для модификации полипептидов AARS согласно изобретению можно использовать метод хемоселективного лигирования, например, путем присоединения полимеров сайт-специфическим и контролируемым образом. Указанный метод в целом основан на включении хемоселективных якорных фрагментов в белковый каркас либо химическим, либо рекомбинантным образом, и последующей модификации с помощью полимера, содержащего комплементарный линкер. В результате процесс сборки и ковалентную структуру полученного конъюгата белок-полимер можно контролировать, обеспечивая целесообразную оптимизацию свойств лекарственного средства, таких как эффективность и фармакокинетические свойства (см., например, Kochendoerfer, *Current Opinion in Chemical Biology* 9:555-560, 2005).

Согласно другим вариантам реализации изобретения также предложены слитые белки полипептида AARS с другими белками, и указанные слитые белки могут повышать биологическую активность, секрецию, направленность, время биологической жизни, способность проникать через клеточные мембраны или гематоэнцефалический барьер или фармакокинетические свойства указанного полипептида AARS. Примеры слитых белков, которые улучшают фармакокинетические свойства ("модификаторов фармако-

кинетических свойств (PK)"), включают, но не ограничиваются перечисленными: белки слияния с человеческим альбумином (Osborn et al.: Eur. J. Pharmacol. 456(1-3): 149-158, (2002)), Fc-доменами антитела, последовательностями поли-Glu или поли-Asp и трансферрином. Кроме того, слитые белки с конформационно измененными полипептидными последовательностями состоят из аминокислот Pro, Ala и Ser ("PASylation") или гидроксизтилкрахмала (который продается под торговой маркой HESYLATION®) обеспечивают простой способ повышения гидродинамического объема полипептида AARS. Указанное дополнительное удлинение вносит объемную рандомную структуру, которая значительно увеличивает размер полученного в результате слитого белка. Указанным способом, как правило, быстрый клиренс более маленьких полипептидов AARS путем почечной фильтрации замедляется на несколько порядков величины. Кроме того, также было показано, что использование гибридных с Ig G белков обеспечивает проницаемость некоторых слитых белков через гематоэнцефалический барьер (Fu et al. (2010), Brain Res. 1352:208-13).

Примеры слитых белков, которые улучшают проницаемость через клеточные мембраны, включают слитые белки с последовательностями транслокации через мембрану. В указанном контексте, термин "последовательности транслокации через мембрану" относится к природным и синтетическим аминокислотным последовательностям, которые способны транслоцироваться через клеточную мембрану. Типичные последовательности транслокации через мембрану включают последовательности на основе природных последовательностей транслокации через мембрану, которые являются производными белка Tat и белка гомеозисной транскрипции Antennapedia, также как и синтетические последовательности, транслоцирующиеся через мембрану целиком или частично, на основе остатков полиаргинина и полилизина. Типичные последовательности транслокации через мембрану включают, например, последовательности, описанные в следующих патентах США: US 5652122; US 5670617; US 5674980; US 5747641; US 5804604; US 6316003; US 7585834; US 7312244; US 7279502; US 7229961; US 7169814; US 7453011; US 7235695; US 6982351; US 6605115; US 7306784; US 7306783; US 6589503; US 6348185; US 6881825; US 7431915; и публикациях международных заявок: WO 0074701 A2; WO 2007111993 A2; WO 2007106554 A2; WO 02069930 A1; WO 03049772 A2; WO 03106491 A2 и WO 2008063113 A1.

Необходимо понимать, что гибкий молекулярный линкер (или спейсер) необязательно ковалентно соединяет и располагается между полипептидом AARS и любым из слитых белков, описанных в настоящем изобретении.

Кроме того, согласно некоторым вариантам реализации изобретения полипептид AARS может содержать синтетические или секретированные естественным образом сигнальные последовательности, которые являются производными других хорошо описанных секретируемых белков. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения указанные белки могут подвергаться процессингу путем протеолитического расщепления с образованием полипептида AARS in situ. Указанные слитые белки включают, например, гибриды полипептида AARS с убиквитином с получением новых N-концевых аминокислот или применения секреции сигнала для обеспечения высокого уровня секреции полипептида AARS во внеклеточную среду, или N- или C-концевыми эпитопными метками для облегчения очистки или выявления.

Полипептиды AARS, описанные в настоящем изобретении, могут быть получены с помощью любого подходящего способа, известного специалистам в данной области техники, такого как рекомбинантные технологии. Кроме способов рекомбинантной продукции, полипептиды согласно изобретению могут быть получены путем прямого синтеза пептида с использованием твердофазных методов (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154 (1963)). Синтез белка можно проводить с использованием неавтоматизированных или автоматизированных способов.

Автоматизированный синтез может осуществляться, например, с использованием пептидного синтезатора Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer). В альтернативном варианте различные фрагменты могут быть синтезированы химическим путем отдельно и объединены с использованием химических способов с получением желательной молекулы.

IV. Полинуклеотиды AARS.

Варианты реализации настоящего изобретения включают полинуклеотиды, которые кодируют один или более новых идентифицированных белковых фрагментов аминокислот-тРНК-синтетазы (AARS), а также соответствующие комплементарные последовательности, варианты и фрагменты. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения полинуклеотид AARS кодирует целый или часть полипептида (полипептидов) эталонной последовательности AARS, приведенной в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, которые представляют собой сплайс-варианты, протеолитические фрагменты или другие типы фрагментов гистидил-тРНК-синтетазы. Конкретные варианты реализации изобретения включают полинуклеотиды, кодирующие полипептиды или белки, которые содержат последовательность одной или более границ сплайсинга указанных сплайс-вариантов, а также соответствующие комплементарные последовательности, варианты и фрагменты. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, как правило, из-за уникальной природы выбранного сплайс-варианта AARS, в котором экзоны скомбинированы новым или исключительным образом, эталонные последовательности полинуклеотида AARS содержат уникальную или исключительную границу сплайсинга. Конкретные варианты реализации изобретения исключают

соответствующий полноразмерный полинуклеотид AARS.

Также полинуклеотиды AARS согласно настоящему изобретению включают праймеры, зонды, антисмысловые олигонуклеотиды и агенты на основе интерферирующей РНК, которые содержат целиком или частично указанные эталонные полинуклеотиды, которые являются комплементарными всему или части указанного эталонного полинуклеотида или которые специфично гибридизуются с указанными эталонными полинуклеотидами, описанными в настоящем изобретении.

Термин "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" в настоящем изобретении обозначает мРНК, РНК, кРНК, кДНК или ДНК. Термин, как правило, относится к полимерной форме нуклеотидов, состоящей по меньшей мере из 10 оснований в длину, либо к рибонуклеотидам или дезоксинуклеотидам или модифицированной форме любого типа нуклеотида. Термин включает одноцепочечные и двуцепочечные формы ДНК. Термины "ДНК" и "полинуклеотид" и "нуклеиновая кислота" относятся к молекуле ДНК, которая была изолирована в свободной от геномной ДНК конкретного вида форме. Таким образом, изолированный сегмент ДНК, кодирующий полипептид, относится к сегменту ДНК, который содержит одну или более кодирующих последовательностей и является при этом по существу изолированным от (или очищенным в форме, свободной от) тотальной геномной ДНК того вида, из которого указанный сегмент ДНК был получен. Также включены некодирующие полинуклеотиды (например, праймеры, зонды, олигонуклеотиды), которые не кодируют полипептид AARS. Термины "сегмент ДНК" и "полинуклеотид" включают сегменты ДНК и более маленькие фрагменты указанных сегментов, и также рекомбинантные векторы, включая, например, плазмиды, космиды, фагмиды, фаги, вирусы и т.п.

Дополнительные кодирующие или некодирующие последовательности могут, но не должны, присутствовать в полинуклеотиде согласно настоящему изобретению, и указанный полинуклеотид может, но не обязательно, быть связан с другими молекулами и/или поддерживающими материалами. Таким образом, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, независимо от самой длины кодирующей последовательности, могут быть комбинированы с другими последовательностями ДНК, такими как промоторы, сигналы полиаденилирования, дополнительные сайты рестрикции ферментом, множество сайтов клонирования, другие кодирующие сегменты и т.п., таким образом, что их общая длина может значительно варьировать.

Таким образом, предполагается, что можно использовать фрагмент полинуклеотида почти любой длины; при этом общая длина предпочтительно ограничивается легкостью получения и применения в предполагаемом протоколе рекомбинантной ДНК. Включены полинуклеотиды, длина которых составляет примерно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 270, 280, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000 или более (включая все целые числа между ними) оснований, включая любую часть или фрагмент (например, более чем примерно 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов в длину) эталонного полинуклеотида AARS (например, количество оснований X-Y, в которых X составляет примерно 1-3000 или более и Y составляет примерно 10-3000 или более,) или ее комплемента.

Варианты реализации настоящего изобретения также включают "варианты" последовательности эталонного полинуклеотида AARS. "Варианты" полинуклеотида могут содержать одну или более замен, добавлений, делеций и/или вставок по сравнению с эталонным полинуклеотидом. В целом вариант последовательности эталонного полинуклеотида AARS может являться по меньшей мере примерно на 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70%, в целом по меньшей мере примерно на 75, 80, 85%, желательно примерно от 90 до 95% или более и более предпочтительно, примерно на 98% или более идентичным конкретной нуклеотидной последовательности, по результатам определения с помощью программ выравнивания последовательностей, описанных в другой части настоящего изобретения, с использованием параметров по умолчанию. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения варианты могут отличаться от эталонной последовательности на примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100 (включая все целые числа между ними) или более оснований. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, например, когда вариант полинуклеотида кодирует полипептид AARS, обладающий неканонической активностью, желаемая активность кодируемого полипептида AARS по существу не уменьшается по сравнению с немодифицированным полипептидом. Влияние на активность закодированного полипептида в целом можно оценивать, как описано в настоящем изобретении.

Конкретные варианты реализации изобретения включают полинуклеотиды, которые гибридизуются с последовательностью эталонного полинуклеотида AARS или с соответствующими комплементарными последовательностями, в условиях жесткости, описанных ниже. В настоящем изобретении термин "гибридизуется в условиях низкой жесткости, средней жесткости, высокой жесткости или условиях очень высокой жесткости" описывает условия для гибридизации и промывки. Руководство для проведения реакций гибридизации можно найти в источнике Ausubel et al. (1998, выше), разделах 6,3,1-6,3,6. Водные и неводные способы описаны в указанной ссылке и любые из них можно применять.

Ссылка в настоящем изобретении на условия низкой жесткости включает и охватывает по меньшей мере от примерно 1% (по объему) до по меньшей мере примерно 15% (по объему) формамида, и по меньшей мере от примерно 1 М, до по меньшей мере примерно 2 М соли, для гибридизации при 42°C и по меньшей мере примерно 1 М до по меньшей мере примерно 2 М соли для промывки при 42°C. Условия низкой жесткости также могут включать 1% бычий сывороточный альбумин (БСА), 1 мМ ЭДТА, 0,5 М NaHPO_4 (pH 7,2), 7% ДСН для гибридизации при 65°C и (i) 2×SSC, 0,1% ДСН; или (ii) 0,5% БСА, 1 мМ ЭДТА, 40 мМ NaHPO_4 (pH 7,2), 5% ДСН для промывки при комнатной температуре. Один вариант реализации условий низкой жесткости включает гибридизацию в 6×SSC (хлорид натрия/цитрат натрия) при примерно 45°C, с последующими двумя промывками в 0,2×SSC, 0,1% ДСН по меньшей мере при 50°C (температура промывок может быть повышена до 55°C для условия низкой жесткости).

Условия средней жесткости включают и охватывают от по меньшей мере примерно 16% (по объему) до по меньшей мере примерно 30% (по объему) и от по меньшей мере примерно 0,5 М до по меньшей мере примерно 0,9 М раствора соли для гибридизации при 42°C и от по меньшей мере примерно 0,1 М до по меньшей мере примерно 0,2 М раствора соли для промывки при 55°C. Условия средней жесткости также могут включать 1% бычий сывороточный альбумин (БСА), 1 мМ ЭДТА, 0,5 М NaHPO_4 (pH 7,2), 7% ДСН для гибридизации при 65°C и (i) 2×SSC, 0,1% ДСН; или (ii) 0,5% БСА, 1 мМ ЭДТА, 40 мМ NaHPO_4 (pH 7,2), 5% ДСН для промывки при 60-65°C. Один вариант реализации условий средней жесткости включает гибридизацию в 6×SSC при примерно 45°C, с последующей одной или более промывками в 0,2×SSC, 0,1% ДСН при 60°C. Условия высокой жесткости включают и охватывают от по меньшей мере примерно 31% (по объему) до по меньшей мере примерно 50% (по объему) формамида и от примерно 0,01 М до примерно 0,15 М раствора соли для гибридизации при 42°C и примерно 0,01 М до примерно 0,02 М раствора соли для промывки при 55°C.

Условия высокой жесткости также могут включать 1% БСА, 1 мМ ЭДТА, 0,5 М NaHPO_4 (pH 7,2), 7% ДСН для гибридизации при 65°C и (i) 0,2×SSC, 0,1% ДСН; или (ii) 0,5% БСА, 1 мМ ЭДТА, 40 мМ NaHPO_4 (pH 7,2), 1% ДСН для промывки при температуре выше 65°C. Один вариант реализации условий высокой жесткости включает гибридизацию в 6×SSC при примерно 45°C, с последующей одной или более промывкой в 0,2×SSC, 0,1% ДСН при 65°C. Один вариант реализации условий очень высокой жесткости включает гибридизацию в 0,5 М растворе фосфата натрия, 7% ДСН при 65°C, с последующей одной или более промывкой в 0,2×SSC, 1% ДСН при 65°C.

Другие условия жесткости хорошо известны в данной области техники, и специалисту в данной области техники ясно, что различные факторы можно регулировать для оптимизации специфичности гибридизации. Оптимизация жесткости конечных промывок может осуществляться для обеспечения высокой степени гибридизации. Подробные примеры см. в источниках Ausubel et al., выше, стр. 2.10.1-2.10.16, и Sambrook et al. (1989, выше) в разделах 1.101-1.104.

Тогда как жесткие отмывки, как правило, осуществляют при температурах от примерно 42°C до 68°C, специалистам в данной области техники очевидно, что другие температуры могут являться подходящими для жестких условий. Максимальная скорость гибридизации, как правило, происходит при температуре, примерно на 20-25°C ниже T_m , для образования гибрида ДНК-ДНК. Хорошо известно в данной области техники, что T_m представляет собой температуру плавления или температуру, при которой две комплементарные полинуклеотидные последовательности диссоциируют. Способы оценки T_m хорошо известны в данной области техники (см. Ausubel et al., выше, с. 2.10.8).

В целом T_m идеального совпадающего дуплекса ДНК можно предсказать приближенно с помощью формулы: $T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10} M) + 0,41 (\%G+C) - 0,63 (\% \text{ формамид}) - (600/\text{длина})$, где М представляет собой концентрацию Na^+ , предпочтительно в диапазоне от 0,01 М до 0,4 М; %G+C представляет собой процент суммы оснований гуанозина и цитозина от общего числа оснований, в диапазоне между 30% и 75% G+C; % формамид представляет собой процентную концентрацию формамида по объему; длина представляет собой число пар оснований в ДНК-дуплексе. T_m дуплекса ДНК снижается приблизительно на 1°C с каждым повышением на 1% количества случайных несовпадений пар оснований. Отмывку в целом осуществляют при T_m 15°C для условий высокой жесткости или T_m 30°C для условий средней жесткости.

В одном примере способа гибридизации мембрану (например, нитроцеллюлозную мембрану или нейлоновую мембрану), содержащую иммобилизованную ДНК, гибридизовали в течение ночи при 42°C в буфере для гибридизации (50% деионизированный формамид, 5×SSC, 5×Раствор Денхардта (0,1% фикоколл, 0,1% поливинилпирролидон и 0,1% бычий сывороточный альбумин), 0,1% ДСН и 200 мг/мл денатурированной ДНК из молока лососевых), содержащую меченый зонд. Затем мембрану подвергали двум последовательным отмывкам средней жесткости (т.е. 2×SSC, 0,1% ДСН в течение 15 мин при 45°C, с последующей 2×SSC, 0,1% ДСН в течение 15 мин при 50°C), с последующими двумя последовательными отмывками высокой жесткости (т.е. 0,2×SSC, 0,1% ДСН в течение 12 мин при 55°C с последующей 0,2×SSC и 0,1% раствора ДСН в течение 12 мин при 65-68°C).

Как отмечено выше, конкретные варианты реализации изобретения относятся к полинуклеотидам AARS, которые кодируют полипептид AARS. Среди других применений, указанные варианты реализа-

ции изобретения можно использовать для рекомбинантной продукции желательного полипептида AARS или его варианта или для экспрессии полипептида AARS в выбранной клетке или субъекте. Специалистам в данной области техники очевидно, что из-за вырожденности генетического кода существует много нуклеотидных последовательностей, которые кодируют полипептид, описанный в настоящем изобретении. Некоторые из указанных полинуклеотидов могут иметь минимальную гомологию с нуклеотидной последовательностью любого нативного гена. Тем не менее, полинуклеотиды, которые различаются из-за различий в частоте использования кодонов, конкретно рассматриваются согласно настоящему изобретению, например, полинуклеотиды, которые оптимизированы для выбора кодона человека и/или примата.

Таким образом, множество полинуклеотидов может кодировать полипептиды AARS согласно изобретению. Более того, полинуклеотидные последовательности можно обрабатывать в различных целях. Примеры включают, но не ограничиваются перечисленными: встраивание предпочтительных кодонов для усиления экспрессии полинуклеотида в различных организмах (см., в целом Nakamura et al., *Nuc. Acid. Res.* (2000), 28 (1): 292). Кроме того, молчащие мутации можно встраивать для введения или устранения сайтов рестрикции, снижения плотности динуклеотидных мотивов CpG (см., например, Kameda et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2006), 349(4): 1269-1277) или снижения способности одноцепочечной последовательности формировать структуры типа "стебель-петля": (см., например, Zuker M., *Nucl. Acid Res.* (2003); 31(13): 3406-3415). Кроме того, экспрессию у млекопитающих можно также оптимизировать путем включения консенсусной последовательности Козака (Kozak) [т.е. (a/g)cc(a/g)ccATGg] в стартовый кодон. Консенсусные последовательности Козака, применимые в указанных целях, известны в данной области техники (Manty et al. *PNAS* 92: 2662-2666 (1995); Mantyh et al., *Prot. Exp. & Purif.* 6, 124 (1995)).

Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, независимо от длины самой кодирующей последовательности, можно комбинировать с другими последовательностями ДНК, такими как промоторы, сигналы полиаденилирования, дополнительные сайты рестрикции ферментами, множество сайтов клонирования, другие кодирующие сегменты и т.п., таким образом, что их общая длина может значительно варьировать. Таким образом, предполагается, что можно использовать фрагмент полинуклеотида почти любой длины; при этом общая длина предпочтительно ограничивается легкостью получения и применения в предполагаемом протоколе рекомбинантной ДНК.

Полинуклеотиды и их гибриды можно получать, обрабатывать и/или экспрессировать с использованием любого из различных общепринятых методов, известных и доступных в данной области техники. Например, полинуклеотидные последовательности, которые кодируют полипептиды согласно изобретению или слитые белки или их функциональные эквиваленты, можно применять в рекомбинантных молекулах ДНК для направления экспрессии полипептида AARS в соответствующих клетках хозяина. Из-за присущей генетическому коду вырожденности могут быть получены другие ДНК последовательности, которые кодируют по существу такую же или функционально эквивалентную аминокислотную последовательность, и указанные последовательности можно применять для клонирования и экспрессии конкретного полипептида.

Специалистам в данной области техники очевидно, что может быть предпочтительным в некоторых примерах получать кодирующие полипептид нуклеотидные последовательности, имеющие неприродные кодоны. Например, кодоны, предпочтительные для конкретного прокариотического или эукариотического хозяина могут быть выбраны для повышения скорости экспрессии белка или для продукции рекомбинантного РНК-транскрипта, имеющего желаемые свойства, такие как время полужизни, которое больше по сравнению с транскриптом, полученным из природной последовательности. Указанные полинуклеотиды обычно называют "кодон-оптимизированные". Любой из полинуклеотидов, описанных в настоящем изобретении, можно использовать в кодон-оптимизированной форме. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения полинуклеотид может быть кодон-оптимизированным для использования в специфических бактериях, таких как *E. coli*, или дрожжах, таких как *S. cerevisiae* (см., например, Burgess-Brown et al., *Protein Expr Purif.* 59:94-102, 2008; Ermolaeva MD (2001), *Curr. Iss. Mol. Biol.* 3(4) 91-7; Welch et al., *PLoS ONE* 4(9): e7007 doi:10.1371/journal.pone.0007002).

Более того, полинуклеотидные последовательности согласно настоящему изобретению могут быть сконструированы с использованием способов, в целом известных в данной области техники, для изменения кодирующих полипептидных последовательностей в различных целях, включая, но не ограничиваясь перечисленными: изменения, которые приводят к модификации клонирования, процессинга, экспрессии и/или активности генного продукта.

В соответствии с другим аспектом изобретения, полинуклеотиды, кодирующие полипептиды согласно изобретению можно доставлять субъекту *in vivo*, например, с использованием методов генной терапии. Генная терапия в целом относится к переносу гетерологичных нуклеиновых кислот в конкретные клетки, клетки-мишени млекопитающего, в частности, человека, страдающего нарушением или состоянием, для лечения которого требуется указанная терапия. Нуклеиновая кислота вводится в выбранные клетки-мишени таким образом, что экспрессируется гетерологичная ДНК, и таким образом, производится закодированный терапевтический продукт.

Различные вирусные векторы, которые можно применять для генной терапии, как описано в на-

стоящем изобретении, включают аденовирус, вирус герпеса, вирус коровьей оспы, аденоассоциированный вирус (AAV), или, предпочтительно, РНК-вирус, такой как ретровирус. Предпочтительно, ретровирусный вектор представляет собой производное ретровируса мышей или птиц или представляет собой лентивирусный вектор. Предпочтительный ретровирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор. Примеры ретровирусных векторов, в которые может быть встроен один чужеродный ген, включают, но не ограничиваются ими: вирус мышинного лейкоза Молони (MoMuLV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус мышинной опухоли молочной железы (MuMTV), вирус иммунодефицита обезьян (SIV), бычий вирус иммунодефицита (BIV), вирус иммунодефицита человека (HIV) и вирус саркомы Рауса (RSV). Ряд дополнительных ретровирусных векторов может включать множество генов. Все из указанных векторов могут переносить или встраивать ген селективного маркера, таким образом, что указанные трансдуцированные клетки могут быть идентифицированы и генерированы. Мишень-специфичный вектор может быть создан, например, путем встраивания интересующей последовательности полипептида, связывающегося с помощью цинкового пальца с ДНК, в вирусный вектор, наряду с другим геном, кодирующим лиганд рецептора специфической клетки-мишени. Могут быть созданы мишень-специфичные ретровирусные векторы путем встраивания, например, полинуклеотида, кодирующего белок (димер). В качестве примера, направленность можно осуществлять путем использования антитела для направленности на ретровирусный вектор. Специалистам в данной области техники известно, или же они могут с легкостью определить без излишней экспериментальной работы, специфические полинуклеотидные последовательности, которые могут быть встроены в ретровирусный генотип для обеспечения мишень-специфической доставки ретровирусного вектора, содержащего полинуклеотид белка, связывающегося с нуклеотидом, имеющим цинковый палец.

Поскольку рекомбинантные ретровирусы являются дефектными, они требуют помощи для продукции инфекционных векторных частиц. Указанная помощь может быть обеспечена, например, путем использования хелперных клеточных линий, которые содержат плазмиды, кодирующие все структурные гены ретровируса под контролем регуляторных последовательностей внутри LTR. Указанные плазмиды лишены нуклеотидной последовательности, которая обеспечивает механизм упаковки для распознавания РНК-транскрипта для инкапсулирования. Хелперные клеточные линии, которые имеют делеции сигнала упаковки, включают, но не ограничиваются перечисленными: PSI.2, PA317 и PA12, например. Указанные клеточные линии продуцируют пустые вирионы, так как никакой геном не упаковывается. Если ретровирусный вектор вводится в такую клетку, в которой сигнал упаковки является интактным, но структурные гены не замещены другими интересующими генами, вектор может быть упакован, и векторный вирион продуцируется. Векторные вирионы, продуцированные указанным способом, могут затем использоваться для инфицирования тканевой клеточной линии, такой как клетки NIH 3T3, для продукции больших количеств гибридных ретровирусных вирионов.

Для генной терапии также можно применять методы "невирусной" доставки, включая, например, комплексы ДНК-лиганд, комплексы аденовирус-лиганд-ДНК, непосредственную инъекцию ДНК, преципитацию CaPO_4 , методы генной пушки, электропорацию, липосомы, липофекцию и т.п. Любой из указанных способов хорошо доступен специалистам в данной области техники и является подходящим для применения согласно настоящему изобретению. Специалистам в данной области техники доступны другие подходящие способы, и необходимо понимать, что настоящее изобретение можно осуществлять с использованием любого из доступных способов трансфекции. Липофекцию можно осуществлять путем инкапсулирования изолированной молекулы ДНК в липосомную частицу и приведения указанной липосомной частицы во взаимодействие с клеточной мембраной клетки-мишени. Липосомы представляют собой самособирающиеся коллоидные частицы, в которых липидный бислой, состоящий из амфифильных молекул, таких как фосфатидилсерин или фосфатидилхолин, инкапсулирует часть окружающей среды, например, липидный бислой окружает гидрофильную внутреннюю часть. Могут быть сконструированы униламеллярные и мультламеллярные липосомы таким образом, что внутренняя часть содержит желаемое химическое соединение, лекарственное средство или, как в примере изобретения, изолированную молекулу ДНК.

Согласно другому аспекту, полинуклеотиды, кодирующие полипептиды согласно изобретению, можно применять для экспрессии и доставки полипептида AARS в рамках клеточной терапии. Соответственно, согласно другому аспекту, настоящее изобретение включает клеточную терапию для лечения заболевания или нарушения, включающую введение хозяйских клеток, экспрессирующих или способных экспрессировать полипептид AARS.

Клеточная терапия включает введение клеток, которые были селектированы, размножены и фармакологически обработаны или изменены (т.е. генетически модифицированы) вне организма (Bordignon, C. et al., *Cell Therapy: Achievements and Perspectives* (1999), *Haematologica*, 84, pp.1110-1149). Указанные клетки-хозяева включают, например, первичные клетки, включая макрофаги и стволовые клетки, которые были генетически модифицированы для экспрессии полипептида AARS. Целью клеточной терапии является замещение, восстановление или усиление биологической функции поврежденных тканей или органов.

Применение трансплантированных клеток исследовали для лечения различных эндокринных нару-

шений, таких как анемия и карликовость, гематологических нарушений, почечной и печеночной недостаточности, недостаточности гипофиза и ЦНС и сахарного диабета (Uludag et al., Technology of Mammalian Cell Encapsulation (2000), Advanced Drug Delivery Reviews, 42, p. 29-64). Трансплантированные клетки могут функционировать путем высвобождения биоактивных соединений, таких как полипептид AARS согласно изобретению, для замещения эндогенных полипептидов AARS, которые отсутствуют или продуцируются в недостаточном количестве в поврежденной системе.

Варианты реализации настоящего изобретения также включают олигонуклеотиды для детектирования, амплификации, терапии с помощью антисмысловых олигонуклеотидов, или для других целей. Для указанных и связанных целей, предполагается, что термин "олигонуклеотид" или "олиго" или "олигомер" включает единственный "олигонуклеотид", а также множество "олигонуклеотидов", и относится к любому полимеру, состоящему из двух или более нуклеотидов, нуклеозидов, нуклеотидных оснований или родственных соединений, используемых в качестве реагента в способах амплификации согласно настоящему изобретению, а также последующих способах выявления.

Олигонуклеотид может представлять собой ДНК и/или РНК и/или их аналоги.

Термин "олигонуклеотид" не обязательно обозначает любую конкретную функцию реагента, вместо этого он используется как общий термин для всех таких реагентов, которые описаны в настоящем изобретении. Олигонуклеотид может иметь различные функции, например, он может действовать как праймер, если он способен гибридизоваться с комплементарной цепочкой и может также быть удлинен в присутствии полимеразы нуклеиновых кислот, указанный олигонуклеотид может обеспечивать промотор, если он содержит последовательность, распознающуюся РНК-полимеразой, и позволяет транскрипцию, он может функционировать для предотвращения гибридизации или препятствовать удлинению праймера, если расположен и/или модифицирован соответствующим образом. Олигонуклеотид также может действовать в качестве зонда или антисмыслового агента. Олигонуклеотид может быть фактически любой длины, которая ограничивается только его специфической функцией, например, в реакции амплификации, в выявлении продукта реакции амплификации или при применении в качестве антисмыслового агента или РНК-интерферирующего агента. Любой из олигонуклеотидов, описанных в настоящем изобретении, может использоваться в качестве праймера, зонда, антисмыслового олигомера или агента на основе интерферирующей РНК.

Термин "праймер" в настоящем изобретении относится к одноцепочечному олигонуклеотиду, способному действовать как точка инициации для зависимого от матрицы синтеза ДНК в подходящих условиях, определяемых, например, буфером и температурой, в присутствии четырех различных нуклеозидтрифосфатов и агентов для полимеризации, таких как ДНК- или РНК-полимераза или обратная транскриптаза. Длина праймера, в любом конкретном случае, зависит, например, от предполагаемого применения праймера и в целом лежит в диапазоне от примерно 15 до 30 нуклеотидов, хотя можно применять более короткие и более длинные праймеры. Молекулы коротких праймеров в целом требуют более холодных температур для образования достаточно стабильных гибридных комплексов с матрицей. Праймер не должен отображать точную последовательность матрицы, но должен быть достаточно комплементарным для гибридизации с указанной матрицей. Сайт праймера представляет собой участок матрицы, с которым праймер гибридизуется. Пара праймеров представляет собой набор праймеров, включая расположенный выше в направлении 5' праймер, который гибридизуется с 5'-концом последовательности, которую предполагается амплифицировать, и расположенный ниже в направлении 3' праймер, который гибридизуется с комплементом 3'-концом последовательности, которую предполагается амплифицировать.

Термин "зонд" в настоящем изобретении включает иммобилизованную на поверхности или растворимую, но способную быть иммобилизованной, молекулу, которая может быть распознана конкретной мишенью. См., например, патент США № 6582908 для примера чипов, имеющих все возможные комбинации зондов с 10, 12 и более основаниями. Зонды и праймеры в настоящем изобретении, как правило, содержат по меньшей мере 10-15 заменимых нуклеотидов известной последовательности. Для повышения специфичности также можно применять более длинные зонды и праймеры, такие как зонды и праймеры, которые содержат по меньшей мере 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или по меньшей мере 150 нуклеотидов эталонной последовательности AARS или ее комплемента. Зонды и праймеры могут быть значительно длиннее, чем указанные примеры, и необходимо понимать, что может использоваться любая длина, в соответствии с уровнем техники и настоящей заявкой, включая таблицы, фигуры и перечень последовательностей.

Способы для получения и использования зондов и праймеров описаны в ссылках, например, Sambrook, J. et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y.; Ausubel, F. M. et al. (1987), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York N.Y.; Innis, M. et al. (1990), PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Сан-Диего, Калифорния. Пары праймеров для ПЦР могут представлять собой пары, которые были получены из известной последовательности, например, путем использования компьютерных программ, предполагаемых для указанных целей, таких как Primer (версия 0,5, 1991, Институт биохимических исследований Уайтхэда, Кембридж, Массачусетс).

Олигонуклеотиды для использования в качестве праймеров или зондов могут быть выбраны с использованием программ, известных в данной области техники. Например, программа OLIGO 4,06 применима для выбора пар праймеров для ПЦР, каждый из которых содержит вплоть до 100 нуклеотидов, и для анализа олигонуклеотидов и более больших полинуклеотидов, содержащих вплоть до 5000 нуклеотидов, из вводимой полинуклеотидной последовательности, содержащей вплоть до 32 тысяч пар нуклеотидов. Подобные программы для выбора праймеров включают дополнительные признаки для расширенных возможностей. Например, программа для выбора праймеров PrimOU (общедоступная из Центра изучения генома Юго-Западного Медицинского Центра Техасского Университета, Даллас, Техас) способна выбирать специфические праймеры из мегабазных последовательностей и, таким образом, применима для создания праймеров в масштабе полного генома.

Программа для выбора праймеров Primer3 (общедоступная в Центре исследования генома Института Уайтхэда/Массачусетского технического института, Кэмбридж, Массачусетс) позволяет пользователю вводить "библиотеку не связывающихся с праймером последовательностей", в которой пользователь выбирает избегаемые последовательности, такие как сайты связывания праймера. Программа Primer3 применима, в частности, для выбора олигонуклеотидов для микрочипов (также может быть получен исходный код для последних двух программ для выбора праймеров из соответствующих источников и модифицирован для удовлетворения конкретным требованиям пользователя). Программа PrimeGen (общедоступная из Исследовательского центра Великобритании, Проект расшифровки генома человека, Кембридж, Великобритания) создает праймеры на основе множественного выравнивания последовательностей, таким образом, позволяя выбор праймеров, которые гибридизуются либо с наиболее консервативным, либо с наименее консервативными участками выровненной последовательности нуклеиновой кислоты. Таким образом, указанная программа применима для идентификации как уникальных, так и консервативных фрагментов олигонуклеотидов и полинуклеотидов. Указанные фрагменты олигонуклеотидов и полинуклеотидов, идентифицированные с помощью любого из выше указанных способов выбора, применимы для использования в методах гибридизации, например, в качестве праймеров для ПЦР или секвенирования, элементов микрочипа или специфических зондов для идентификации полностью или частично комплементарных полинуклеотидов в образце нуклеиновых кислот. Способы выбора олигонуклеотидов не ограничиваются способами, описанными в настоящем изобретении.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения олигонуклеотиды могут быть получены путем поэтапного твердофазного синтеза, с использованием способов, подробно описанных в ссылках, цитированных выше и далее, имеющих отношение к синтезу олигонуклеотидов, имеющих как незаряженные, так и катионные скелетные связи. В некоторых случаях, может быть желательным добавлять дополнительные химические фрагменты к олигонуклеотиду, например, для усиления фармакокинетики или для облегчения захвата или выявления соединения. Такой фрагмент может быть ковалентно связан, как правило, с концом олигомера, в соответствии со стандартными способами синтеза. Например, добавление фрагмента полиэтиленгликоля или другого гидрофильного полимера, например, полимера, содержащего 10-100 мономерных субъединиц, может применяться для повышения растворимости. Одна или более заряженных групп, например, анионных заряженных групп, таких как органические кислоты, могут усиливать клеточный захват.

Для придания олигонуклеотиду или белку способности поддаваться выявлению можно применять различные поддающиеся выявлению молекулы, такие как радиоизотопы, флуорохромы, красители, ферменты, наночастицы, хемилюминесцентные маркеры, биотин или другие мономеры, известные в данной области техники, которые могут выявляться непосредственно (например, путем облучения светом) или не непосредственно (например, путем связывания флуоресцентно меченного антитела).

Радиоизотопы представляют собой примеры поддающихся выявлению молекул, которые можно использовать согласно конкретным аспектам настоящего изобретения. Некоторые радиоизотопы можно применять в качестве поддающихся выявлению молекул для мечения нуклеотидов или белков, включая, например, ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^3H и ^{125}I . Указанные радиоизотопы имеют различные периоды полураспада, типы распада и уровни энергии, которые могут быть оптимизированы в соответствии с требованиями конкретного протокола. Например, ^3H представляет собой низкоэнергетический излучатель, который обеспечивает низкий фоновый уровень, однако, указанное низкоэнергетическое излучение также обеспечивает длительные временные периоды для автордиографии. Радиоактивно меченные рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды и аминокислоты являются коммерчески доступными. Доступны нуклеотиды, которые являются радиоактивно мечеными по первой, или α , фосфатной группе или третьей, или γ , фосфатной группе. Например, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{ dATP}$ и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ dATP}$ являются коммерчески доступными. Кроме того, радиоактивно меченные нуклеотиды, обладающие различными специфическими видами активности, также являются коммерчески доступными и могут быть адаптированы для различных протоколов. Другие примеры поддающихся выявлению молекул, которые можно применять для выявления олигонуклеотида, включают флуорофоры. Некоторые флуорофоры можно применять для мечения нуклеотидов, включая, например, флуоресцеин, тетраметилродамин, краситель Texas Red и ряд других флуорофоров (см., например, Haugland, Handbook of Fluorescent Probes - 9th Ed., 2002, Molec. Probes, Inc., Eugene

OR; Haugland, The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies-10th Ed., 2005, Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США).

В качестве одного примера, олигонуклеотиды могут быть флуоресцентно мечены в процессе химического синтеза, так как включение аминов или тиолов во время синтеза нуклеотидов обеспечивает добавление флуорофоров. Флуоресцентно меченные нуклеотиды являются коммерчески доступными. Например, доступны уридин- и дезоксиуридинтрифосфаты, конъюгированные с десятью различными флуорофорами, которые охватывают весь цветовой спектр. Флуоресцентные красители, которые могут быть связаны непосредственно с нуклеотидами, также можно применять в качестве поддающихся выявлению молекул. Например, красители FAM, JOE, TAMRA и ROX представляют собой аминные реактивные флуоресцентные красители, которые были присоединены к нуклеотидам и используются для автоматизированного секвенирования ДНК. Указанные флуоресцентно меченные нуклеотиды, например, ROX-ddATP, ROX-ddCTP, ROX-ddGTP и ROX-ddUTP, являются коммерчески доступными.

Не радиоактивные и не флуоресцентные поддающиеся выявлению молекулы также доступны. Как отмечено выше, биотин может быть присоединен непосредственно к нуклеотидам и выявляться с помощью специфического и высоко аффинного связывания с авидином или стрепавидином, который химически связан с ферментом, катализирующим колориметрическую реакцию (таким как фосфатаза, люцифераза или пероксидаза). Меченные дигоксигенином нуклеотиды также можно применять подобным образом для не изотопного выявления нуклеиновых кислот. Биотинилированные и меченные дигоксигенином нуклеотиды являются коммерчески доступными.

Очень маленькие частицы, называемые наночастицами, также можно применять для мечения олигонуклеотидных зондов. Указанные частицы варьируют в размере от 1 до 1000 нм и включают различные химические структуры, такие как частицы золота и серебра и квантовые точки. При облучении случайным преломленным дневным светом указанные наночастицы золота и серебра, варьирующие по размеру от 40 до 120 нм, рассеивают монохроматический свет с высокой интенсивностью. Длина волны рассеянного света зависит от размера частицы. Каждая из четырех - пяти различных частиц в непосредственной близости рассеивает монохроматический свет, который при наложении дает специфический уникальный цвет. Частицы изготавливаются такими компаниями, как Genicon Sciences (Карлсбад, Калифорния).

Дериватизированные частицы золота и серебра могут быть присоединены к широкому разнообразию молекул, включая белки, антитела, низкомолекулярные соединения, лиганды рецептора и нуклеиновые кислоты. Например, поверхность частицы может быть химически дериватизирована для обеспечения способности присоединения к нуклеотиду.

Другие типы наночастиц, которые можно применять для выявления поддающейся выявлению молекулы, включают квантовые точки. Квантовые точки представляют собой флуоресцирующие кристаллы диаметром 1-5 нм, которые возбуждаются светом в большом диапазоне длин волн. При возбуждении светом, имеющим соответствующую длину волны, указанные кристаллы испускают свет, такой как монохроматический свет, с длиной волны, зависящей от их химического состава и размера. Квантовые точки, такие как CdSe, ZnSe, InP или InAs, обладают уникальными оптическими свойствами; указанные и подобные квантовые точки доступны из ряда коммерческих источников (например, NN-Labs, Фаetteвилл, Арканзас; Ocean Nanotech, Фаetteвилл, Арканзас; Nanoco Technologies, Манчестер, Великобритания; Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури).

Множество классов частиц может быть создано в соответствии с несколькими классами размеров кристаллов из квантовых точек. Классы размеров кристаллов получают либо 1) путем строгого контроля параметров образования кристалла для создания частиц каждого желаемого класса размера или 2) путем создания серии кристаллов без строгого контроля параметров образования кристалла с последующим сортированием в соответствии с желаемым размером и/или длиной волны испускания. Два примера ссылок, в которых квантовые точки помещали в эпитаксиальные слои из кремния с собственной проводимостью полупроводникового испускающего свет/выявляющего устройства, представляют собой патенты США № 5293050 и 5354707, Chappie Sokol, et al.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения олигонуклеотидные праймеры или зонды могут быть мечены одним или более светоизлучающими или другими детектируемыми красителями. Свет, испускаемый красителями, может представлять собой видимый свет или невидимый свет, например, ультрафиолет или инфракрасный свет. Согласно типичным вариантам реализации изобретения краситель может представлять собой краситель на основе резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET); ксантиновый краситель, такой как флуоресцеин и родамин; краситель, который содержит аминную группу в альфа- или бета-положении (такой как нафтиламиноновый краситель, 1-диметиламинанафтил-5-сульфонат, 1-анилино-8-нафталинсульфонат и 2-п-толуидинил-6-нафталинсульфонат); краситель, который содержит 3-фенил-7-изоцианатокумарин; акридин, такой как 9-изотиоцианатоакридин и акридин оранжевый; пирен, бензоксадиазол и стилбен; краситель, который содержит 3-(ε-карбоксистентил)-3'-этил-5,5'-диметиллоксакробоцианин (CYA); 6-карбоксистентилфлуоресцеин (FAM); 5,6-карбоксистентил-110 (R110); 6-карбоксистентил-6G (R6G); N,N,N',N'-тетраметил-6-карбоксистентил (TAMRA); 6-карбоксистентил-

X-родамин (ROX); 6-карбоксихлор-2',7'-диметоксифлуоресцеин (JOE); ALEXA FLUOR™; Cy2; Texas Red и родамин красный; 6-карбоксихлор-2',4,7,7'-тетрахлорфлуоресцеин (TET); 6-карбоксихлор-2',4,4',5',7,7'-гексахлорфлуоресцеин (HEX); 5-карбоксихлор-2',4',5',7'-тетрахлорфлуоресцеин (ZOE); NAN; NED; Cy3; Cy3,5; Cy5; Cy5,5; Cy7 и Cy7,5; IR800CW, ICG, Alexa Fluor 350; Alexa Fluor 488; Alexa Fluor 532; Alexa Fluor 546; Alexa Fluor 568; Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 680 или Alexa Fluor 750.

Полинуклеотиды и олигонуклеотиды AARS согласно настоящему изобретению могут применяться в любых терапевтических, диагностических, научно-исследовательских или связанных с поиском лекарственных средств композициях и способах, описанных в настоящем изобретении.

V. Антитела.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения, также предложены антитела, которые проявляют специфичность связывания в отношении полипептида AARS или его нативного клеточного партнера по связыванию (т.е. партнера по связыванию, представляющего собой клеточный рецептор, липид, углевод, белок или нуклеиновую кислоту), или их комплексов, и способы их применения. Термин антитело включает его различные варианты, такие как FAB, человеческие антитела, модифицированные человеческие антитела, одиночные цепи, нечеловеческие антитела и другие производные укладки иммуноглобулиновой молекулы, лежащие в основе лигандов антигенов иммунной системы, описанных в настоящем изобретении и известных в данной области техники. Антитела могут применяться в любом из терапевтических, диагностических способов, способов поиска лекарственных средств или способов экспрессии/очистки белков и в композициях, предложенных в настоящем изобретении.

Конкретные антитела согласно настоящему изобретению отличаются от конкретных ранее созданных антител, поскольку они могут распознавать белковые фрагменты AARS, приведенные в табл. 1-3, или 4-6, или 7-9, и их соответствующий полноразмерный AARS, как правило, при связывании с большей аффинностью с белковыми фрагментами AARS, чем с соответствующим полноразмерным AARS. В целом указанные антитела могут связываться с уникальными последовательностями или структурами, которые образуются или открываются в результате сплайсинга, протеолиза или другого клеточного процессинга, приводящего к образованию белкового фрагмента AARS согласно изобретению (например, посттрансляционного процессинга, включая, но не ограничиваясь перечисленными: фосфорилирование и другие модификации, которые изменяют структуру белка). Согласно некоторым аспектам, антитела могут связываться с последовательностями вокруг уникальной границы сплайсинга (например, с одним или более участками, состоящими по меньшей мере из 5 последовательных аминокислот, выбранных из последовательностей границы сплайсинга, перечисленных в табл. 2B, 5B или 8B, или, в альтернативном варианте с любой аминокислотной последовательностью С-конца указанного сайта сплайсинга, например, такой как перечисленные в табл. 2B, 5B или 8B. Например, указанные антитела могут иметь специфичность связывания с одной или более не открытыми для растворителя поверхностями, которые открыты в белковом фрагменте AARS, но не в полноразмерном AARS, или последовательностями, которые не обнаруживаются или являются другим образом недоступными в полноразмерном AARS. Антитела также могут связываться с уникальной трехмерной структурой, которая является результатом различий между укладкой белкового фрагмента AARS и полноразмерной AARS. Указанные различия в укладке могут быть локализованными (например, в специфическом домене или области) или глобальными. В качестве одного примера, укладка белковых фрагментов AARS может приводить к получению уникальных непрерывных или дискретных эпитопов, которые не обнаруживаются в соответствующей или исходной AARS. Примеры также включают антитела, которые специфично связываются с N- или С-концом, образованным в результате сплайсинга, протеолиза или другого клеточного процессинга; указанные концы могут являться уникальными по сравнению с полноразмерной AARS или могут не являться открытыми для связывания антитела в полноразмерной версии из-за того, что ее концы полностью или частично погружены в общую структуру более крупной исходной молекулы AARS.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения антитела, предложенные в настоящем изобретении, не образуют агрегатов, имеют желаемую растворимость и/или имеют профиль иммуногенности, который является подходящим для применения у людей, как описано в настоящем изобретении и известно в данной области техники. Также включены антитела, которые являются подходящими для способов обработки, например, для очистки белковых фрагментов AARS, описанных в настоящем изобретении. Предпочтительно, активные антитела могут быть концентрированы по меньшей мере до примерно 10 мг/мл, и необязательно представлены в виде лекарственной формы для биотерапевтического применения.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения антитела являются эффективными для модуляции одной или более из неканонических видов активности, опосредованных полипептидом AARS согласно изобретению. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения антитело, например, представляет собой антитело, которое связывается с полипептидом AARS и/или его партнером по связыванию, ингибирует их способность взаимодействия друг с другом и/или проявляет антагонизм в отношении неканонической активности полипептида AARS. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения антитело, например, связывается с клеточным партнером по связыванию полипептида AARS и имитирует активности полипептида AARS, например, путем повышения или проявления агонизма в от-

ношении неканонической активности, опосредованной полипептидом AARS. Соответственно, антитела можно применять для диагностики, лечения или предотвращения заболеваний, нарушений или других состояний, которые опосредуются полипептидом AARS согласно изобретению, например, путем проявления частичного или полного антагонизма или агонизма в отношении его активности.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, называется "специфично связывающимся", "иммунологически связывающимся" и/или "иммунологически реактивным" с полипептидом согласно изобретению, если оно реагирует на детектируемом уровне (например, с помощью анализа методом твердофазного ИФА) с полипептидом и не реагирует на детектируемом статистически значимом уровне с неродственными полипептидами при таких же условиях. В конкретных примерах, связывающий агент значительно не взаимодействует с полноразмерной версией полипептида AARS.

Иммунологическое связывание, при использовании в данном контексте, в целом относится к нековалентным взаимодействиям такого типа, которые возникают между молекулой иммуноглобулина и антигеном, к которому специфичен указанный иммуноглобулин. Сила или аффинность связывания таких взаимодействий, как иммунологическое связывание, может быть выражена с помощью константы диссоциации (K_d) взаимодействия, где меньшее значение K_d соответствует большей аффинности. Свойства иммунологического связывания выбранных полипептидов можно количественно оценить с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. См., например, Davies et al. (1990) *Annual Rev. Biochem.* 59:439-473. Согласно конкретным иллюстративным вариантам реализации изобретения аффинность антитела к белковому фрагменту AARS составляет по меньшей мере примерно 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40 или 50 нМ. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения аффинность антитела к белковому фрагменту AARS сильнее, чем его аффинность к соответствующему полноразмерному полипептиду AARS, как правило, примерно в 1,5х, 2х, 2,5х, 3х, 3,5х, 4х, 4,5х, 5х, 6х, 7х, 8х, 9х, 10х, 15х, 20х, 25х, 30х, 40х, 50х, 60х, 70х, 80х, 90х, 100х, 200х, 300х, 400х, 500х, 600х, 700х, 800х, 900х, 1000х или более раз (включая все целые числа между ними). Согласно конкретным вариантам реализации изобретения аффинность антитела к соответствующему полноразмерному белку AARS составляет по меньшей мере примерно 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мкМ. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения антитело слабо связывается или по существу не связывается на выявляемом уровне с полноразмерным белком AARS.

"Сайт связывания антигена" или "связывающий участок" антитела, относится к части молекулы иммуноглобулина, которая принимает участие в связывании антигена. Сайт связывания антигена формируется аминокислотными остатками N-концевых переменных ("V") участков тяжелой ("H") и легкой ("L") цепи. Три высоко дивергентных последовательности внутри V-участков тяжелых и легких цепей называются "гипервариабельными участками", которые располагаются между более консервативными фланкирующими последовательностями, известными как "каркасные участки" или "FR". Таким образом, термин "FR" относится к аминокислотным последовательностям, которые в естественных условиях находятся между и прилегают к гипервариабельным участкам в иммуноглобулинах. В молекуле антитела три гипервариабельных участка легкой цепи и три гипервариабельных участка тяжелой цепи располагаются друг относительно друга в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности. Антигенсвязывающая поверхность является комплементарной трехмерной поверхности связываемого антигена, и три гипервариабельных участка каждой из тяжелых и легких цепей называются "определяющими комплементарность участками" или "CDR".

Антитела могут быть получены с помощью любого из различных методов, известных специалистам в данной области техники. См., например, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Моноклональные антитела, специфичные к интересующему полипептиду, могут быть получены, например, с использованием метода, предложенного Кохлером и Мильштейном (Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.* 5:511-519, 1976), и его усовершенствованных вариантов. Также включены способы, в которых используются трансгенные животные, такие как мыши, для экспрессии человеческих антител. См., например, Neuberger et al., *Nature Biotechnology* 14:826, 1996; Lonberg et al., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101, 1994; and Lonberg et al., *Internal Review of Immunology* 13:65-93, 1995. Конкретные примеры включают технологию VELOCIMMUNE®, разработанную компанией REGENERON® (см., например, патент США № 6596541). Антитела также могут быть созданы или идентифицированы путем использования библиотек фагового дисплея и дрожжевого дисплея (см., например, патент США № 7244592; Chao et al., *Nature Protocols* 1:755-768, 2006). Неограничивающие примеры доступных библиотек включают клонированные или синтетические библиотеки, такие как комбинаторная библиотека человеческих антител (HuCAL), в которой репертуар структурного разнообразия человеческих антител представлен генами семи переменных участков тяжелой цепи и семи переменных участков легкой цепи. Комбинация указанных генов дает начало 49 каркасам в основной библиотеке. Путем перекрытия высоко переменных генетических кассет (CDR = определяющие комплементарность участки = гипервариабельные участки) указанных каркасов, может быть получено большое количество разнообразных человеческих антител. Также включены человеческие библиотеки, созданные на основе

фрагментов, полученных от доноров, представляющих собой людей, кодирующие вариабельный участок легкой цепи, CDR-3 тяжелой цепи, синтетическую ДНК, кодирующую разнообразие CDR-1 тяжелой цепи, и синтетическую ДНК, кодирующую разнообразие CDR-2 тяжелой цепи. Другие библиотеки, подходящие для использования, очевидны специалистам в данной области техники. Полипептиды согласно настоящему изобретению можно применять в процессе очистки, например, на этапе аффинной хроматографии.

Фрагмент "Fv" может быть получен путем предпочтительного протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина IgM и редко встречающихся молекул иммуноглобулинов IgG или IgA. Fv-фрагменты однако чаще получают с использованием рекомбинантных методов, известных в данной области техники. Fv-фрагмент включает нековалентный гетеродимер $V_H::V_L$, содержащий антигенсвязывающий сайт, который в значительной степени сохраняет способность нативной молекулы антитела распознавания и связывания антигена. См., например, Inbar et al. (1972), Proc. Nat. Acad. Sci. США 69:2659-2662; Hochman et al. (1976), Biochem 15:2706-2710; и Ehrlich et al. (1980), Biochem 19:4091-4096.

Одноцепочечный полипептид Fv ("sFv") представляет собой ковалентно связанный гетеродимер $V_H::V_L$, который получен из слитых генов, включающих V_H - и V_L -кодирующие гены, связанные пептид-кодирующим линкером. Huston et al. (1988), PNAS США. 85(16):5879-5883. Был описан ряд способов для определения химической структуры для превращения природных ассоциированных, но химически отдельных, легких и тяжелых полипептидных цепей из вариабельной области антитела в молекулу sFv, которая укладывается в трехмерную структуру, по существу подобную структуре антигенсвязывающего сайта. См., например, патенты США № 5091513 и 5132405, Huston et al.; и патент США № 4946778, Ladner et al.

Каждая из описанных выше молекул включает набор CDR тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно, расположенный между набором FR указанной тяжелой и легкой цепи, который обеспечивает поддержку CDR и определяет пространственное расположение CDR относительно друг друга. В настоящем изобретении термин "набор CDR" относится к трем гипервариабельным участкам вариабельной области тяжелой и легкой цепей. Начиная с N-конца тяжелой и легкой цепи, указанные участки обозначаются как "CDR1", "CDR" и "CDR3" соответственно. Антигенсвязывающий сайт, таким образом, включает шесть CDR, включающих группу CDR из каждой вариабельной области тяжелой и легкой цепи. Полипептид, содержащий один CDR, (например, CDR1, CDR2 или CDR3), называется в настоящем изобретении "единицей молекулярного распознавания". Кристаллографический анализ ряда комплексов антиген-антитело показал, что аминокислотные остатки CDR образуют сильный контакт со связанным антигеном, где наиболее сильный контакт с антигеном обеспечивает CDR3 тяжелой цепи. Таким образом, единицы молекулярного распознавания, главным образом, отвечают за специфичность антигенсвязывающего сайта.

В настоящем изобретении термин "ряд FR" относится к четырем фланкирующим аминокислотным последовательностям, которые ограничивают CDR группы CDR тяжелой и легкой цепи вариабельной области. Некоторые остатки FR могут контактировать со связанным антигеном; однако, FR в первую очередь отвечают за укладку вариабельной области в антигенсвязывающем сайте, в частности, остатков FR, непосредственно прилежащих к CDR. Конкретные аминокислотные остатки в FR и конкретные структурные признаки являются очень высоко консервативными. В этом отношении, все последовательности вариабельной области содержат внутреннюю дисульфидную петлю, содержащую примерно 90 аминокислотных остатков. Когда вариабельные области укладываются в сайт связывания, CDR образует выступающие петлевые мотивы, которые образуют антигенсвязывающую поверхность. В целом считается, что именно консервативные структурные участки FR влияют на укладку петель CDR в конкретных "традиционных" структурах, независимо от точной аминокислотной последовательности CDR. Более того, конкретные остатки FR, как известно, принимают участие в нековалентных междоменных контактах, которые стабилизируют взаимодействие тяжелых и легких цепей антитела.

Конкретные варианты реализации изобретения включают однодоменное антитело (sdAB или "нанотело"), которое относится к фрагменту антитела, состоящему из одного мономерного вариабельного домена антитела (см., например, патенты США № 5840526; 5874541; 6005079, 6765087, 5800988; 5874541 и 6015695). Указанные sdAB, как правило, имеют молекулярную массу примерно 12-15 кДа. Согласно конкретным аспектам изобретения, sdAB и другие молекулы антител могут быть получены или изолированы из уникальной тяжелой цепи антител иммунизированных верблюдов и лам, которые часто называют камелидами. См., например, Conrath et al., JBC. 276:7346-7350, 2001.

Был описан ряд "гуманизированных" молекул антител, содержащих антигенсвязывающий сайт, произошедший из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, включая гибридные антитела, содержащие вариабельные области грызунов и ассоциированный с ними CDR, слитые с человеческим константными доменами (Winter et al. (1991), Nature 349:293-299; Lobuglio et al. (1989), Proc. Nat. Acad. Sci. США 86:4220-4224; Shaw et al. (1987), J. Immunol. 138:4534-4538; Brown et al. (1987), Cancer Res. 47:3577-3583), CDR грызунов, привитые на человеческие поддерживающие FR-участки перед гибридизацией с соответствующим константным доменом человеческого антитела (Riechmann et al. (1988), Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988), Science 239:1534-1536; Jones et al. (1986), Nature 321:522-525) и CDR грызунов привитые на поддерживающие рекомбинантные человеческие FR-участки грызунов (пуб-

ликация европейского патента № 519596, опубликованная 23 декабря 1992 г.). Указанные "гуманизированные" молекулы были созданы для минимизации нежелательной иммунологической реакции на молекулы античеловеческих антител грызунов, ограничивающей длительность и эффективность терапевтического применения указанных фрагментов у реципиентов, представляющих собой людей. См., например, патенты США № 5530101; 5585089; 5693762; 6180370 и 7022500.

Антитела согласно настоящему изобретению можно применять в любых терапевтических, диагностических целях для поиска лекарственных средств, очистки белка и в аналитических способах и композициях, описанных в настоящем изобретении.

VI. Альтернативы антител и другие связывающие агенты.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, также предложены альтернативы антител или другие связывающие агенты, такие как растворимые рецепторы, аднектины, пептиды, пептидомиметики, низкомолекулярные соединения, аптамеры, и т.д., которые проявляют специфичность связывания в отношении полипептида AARS или его клеточного партнера по связыванию, описанного в настоящем изобретении, или в отношении его части, варианта или производного, и композиции и способы их применения. Связывающие агенты могут применяться в любой из терапевтических, диагностических целей, в целях поиска лекарственных средств или экспрессии/очистки белка и в аналитических способах и композициях, описанных в настоящем изобретении. Биологические связывающие агенты, такие как аднектины, растворимые рецепторы, авимеры и тринектины, являются особо применимыми.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения указанные связывающие агенты являются эффективными для модуляции одной или более неканонических видов активности, опосредуемых полипептидом AARS согласно изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения связывающий агент, например, представляет собой агент, который связывается с полипептидом AARS и/или его партнером по связыванию, ингибирует их способность взаимодействовать друг с другом и/или проявляет антагонизм в отношении неканонической активности полипептида AARS. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения связывающий агент, например, связывается с клеточным партнером по связыванию полипептида AARS и имитирует активность полипептида AARS, например, путем повышения или проявления агонизма в отношении неканонической активности, опосредованной полипептидом AARS. Соответственно, такие связывающие агенты можно применять для диагностики, лечения или предотвращения заболеваний, нарушений или других состояний, который являются опосредованными полипептидом AARS согласно изобретению, например, путем проявления частичного или полного антагонизма или агонизма в отношении его активности.

Считается, что связывающий агент "специфично связывается" с полипептидом AARS согласно изобретению или его клеточным партнером по связыванию, если он реагирует на детектируемом уровне (в рамках, например, анализа методом твердофазного ИФА) с полипептидом или его клеточным партнером по связыванию и не реагирует на статистически значимом детектируемом уровне с неродственными полипептидами при таких же условиях. В конкретных примерах, связывающий агент значительно не взаимодействует с полноразмерной версией полипептида AARS. Согласно конкретным иллюстративным вариантам реализации изобретения аффинность связывающего агента к белковому фрагменту AARS или его клеточному партнеру связывания составляет по меньшей мере примерно 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40 или 50 nM. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения аффинность связывающего агента к белковому фрагменту AARS сильнее, чем его аффинность к соответствующему полноразмерному полипептиду AARS, как правило, примерно в 1,5x, 2x, 2,5x, 3x, 3,5x, 4x, 4,5x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 15x, 20x, 25x, 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x, 200x, 300x, 400x, 500x, 600x, 700x, 800x, 900x, 1000x или более раз (включая все целые числа между ними). Согласно конкретным вариантам реализации изобретения аффинность связывающего агента к соответствующему полноразмерному белку AARS составляет по меньшей мере примерно 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 μM.

Как отмечено выше, в качестве связывающих агентов включены пептиды. Термин "пептид", как правило, относится к полимеру аминокислотных остатков и их вариантов и синтетических аналогов. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения термин "пептид" относится к относительно коротким полипептидам, включая пептиды, которые состоят из примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот, включая все целые числа и диапазоны между ними (например, 5-10, 8-12, 10-15), и взаимодействуют с полипептидом AARS, его клеточным партнером по связыванию, или обоими. Пептиды могут состоять из природных аминокислот и/или не природных аминокислот, описанных в настоящем изобретении.

Кроме пептидов, состоящих только из природных аминокислот, также предложены пептидомиметики или аналоги пептидов. Аналоги пептидов обычно используются в фармацевтической промышленности как непептидные лекарственные средства, обладающие свойствами, аналогичными свойствам эталонного пептида. Указанные типы непептидных соединений называются "миметиками пептидов" или "пептидомиметиками" (Luthman, et al., A Textbook of Drug Design and Development, 14:386-406, 2nd Ed., Harwood

Academic Publishers (1996); Joachim Grante, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:1699-1720 (1994); Fauchere, J., *Adv. Drug Res.*, 15:29 (1986); Veber and Freidinger *TINS*, p. 392 (1985); Evans, et al., *J. Med. Chem.* 30:229 (1987)). Пептидомиметик представляет собой молекулу, которая имитирует биологическую активность пептида, но не является пептидной по своей химической природе. Соединения, представляющие собой пептидомиметики, известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 6245886.

Настоящее изобретение также включает пептоиды. Пептоидные производные пептидов представляют собой другую форму модифицированных пептидов, которые сохраняют структурные детерминанты, важные для биологической активности, но не имеют пептидных связей, таким образом, приобретая устойчивость к протеолизу (Simon, et al., *PNAS США*. 89:9367-9371, 1992). Пептоиды представляют собой олигомеры N-замещенных глицинов. Был описан ряд N-алкильных групп, каждая из которых соответствует боковой цепи природной аминокислоты.

Пептидомиметики согласно настоящему изобретению включают соединения, в которых по меньшей мере один аминокислотный остаток, несколько аминокислотных остатков или все аминокислотные остатки замещены на соответствующие N-замещенные глицины. Пептоидные библиотеки описаны, например, в патенте США № 5811387.

Связывающий агент также может включать одну или более малых молекул. "Малая молекула" относится к органическому соединению, которое имеет синтетическую или биологическую природу (биомолекула), но, как правило, не является полимером. Органические соединения относятся к большому классу химических соединений, молекулы которых содержат углерод, как правило, за исключением тех молекул, которые содержат только карбонаты, простые оксиды углерода или цианиды. Термин "биомолекула" в целом относится к органической молекуле, которая продуцируется живым организмом, включая крупные полимерные молекулы (биополимеры), такие как пептиды, полисахариды и нуклеиновые кислоты, также как и низкомолекулярные соединения, такие как первичные и вторичные метаболиты, липиды, фосфолипиды, гликолипиды, стеринны, глицеринипиды, витамины и гормоны. Термин "полимер" в целом относится к большой молекуле или макромолекуле, состоящей из повторяющихся структурных единиц, которые, как правило, связаны ковалентными химическими связями.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения молекулярная масса низкомолекулярного соединения составляет менее чем 1000-2000 Дальтон (Да), как правило, между примерно 300 и 700 Да, и включая примерно 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 или 2000 Да. Библиотеки малых молекул описаны в другой части настоящего изобретения.

В качестве связывающих агентов также предложены аптамеры (см., например, Ellington et al., *Nature*. 346, 818-22, 1990; и Tuerk et al., *Science*. 249, 505-10, 1990). Примеры включенных аптамеров представляют собой аптамеры нуклеиновых кислот (например, ДНК-аптамеры, РНК-аптамеры) и пептидные аптамеры. Аптамеры нуклеиновых кислот в целом относятся к видам нуклеиновых кислот, которые были сконструированы с помощью повторяющихся циклов селекции *in vitro* или эквивалентного способа, такого как SELEX (систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением), для связывания с различными молекулярными мишенями, такими как низкомолекулярные соединения, белки, нуклеиновые кислоты и даже клетки, ткани и организмы. См., например, патенты США № 6376190 и 6387620. Таким образом, включены аптамеры нуклеиновых кислот, которые связываются с полипептидами AARS, описанными в настоящем изобретении, и/или их партнерами по связыванию.

Пептидные аптамеры, как правило, включают вариативную пептидную петлю, присоединенную с обоих концов к белковому каркасу, двойное закрепление структуры, которое, как правило, повышает аффинность связывания пептидного аптамера до уровня, сравнимого с уровнем для антитела (например, в наномолярном диапазоне). Согласно конкретным вариантам реализации изобретения длина вариативной петли может составлять примерно 10-20 аминокислот (включая все целые числа между ними), и каркас может включать любой белок, который имеет хорошие свойства растворимости и укладки. Конкретные типичные варианты реализации изобретения могут использовать бактериальный белок Thioredoxin-A в качестве белка каркаса, при этом вариативная петля встроена в сайты пониженной активности (-Cys-Gly-Pro-Cys- петля в белке дикого типа), при этом боковые цепи двух цистеинов способны образовывать дисульфидный мостик. Способы идентификации пептидных аптамеров описаны, например, в заявке на патент США № 2003/0108532. Таким образом, включены пептидные аптамеры, которые связываются с полипептидами AARS, описанными в настоящем изобретении и/или их партнерами по связыванию. Выбор пептидного аптамера может осуществляться с использованием различных систем, известных в данной области техники, включая дрожжевую двугибридную систему.

Также включены АДНЕКТИНЫ™, АВИМЕРЫ™, анафоны и антикаины, которые специфично связываются с белковым фрагментом AARS согласно изобретению. АДНЕКТИНЫ™ относятся к классу нацеленных биологических препаратов, производных человеческого фибронектина, распространенного внеклеточного белка, который в природе связывается с другими белками. См., например, заявки на патенты США № 2007/0082365; 2008/0139791 и 2008/0220049. АДНЕКТИНЫ™, как правило, состоят из природного скелета фибронектина, а также нескольких направленных доменов специфической части человеческого фибронектина. Направленные домены могут быть сконструированы для обеспечения спе-

цифического распознавания АДНЕКТИНОМ™ терапевтической интересующей мишени, такой как белковый фрагмент AARS согласно изобретению.

АВИМЕРЫ™ относятся к мультимерным связывающим белкам или пептидам, сконструированным путем перестановок экзонов *in vitro* и фагового дисплея. Несколько связывающих доменов соединяют, что приводит к большей аффинности и специфичности по сравнению с иммуноглобулиновыми доменами с одним эпитопом. См., например, Silverman et al., *Nature Biotechnology*. 23:1556-1561, 2005; патент США № 7166697; и заявки на патенты США № 2004/0175756, 2005/0048512, 2005/0053973, 2005/0089932 и 2005/0221384.

Также включены сконструированные белки с анкириновым повтором (дарпины), которые включают класс не иммуноглобулиновых белков, которые могут обеспечивать преимущество по сравнению с антителами с точки зрения связывания мишени в поиске лекарственных средств и разработке лекарственных средств. Среди других применений, дарпины наилучшим образом изучены для *in vivo* отображения или доставки токсинов или других терапевтических грузов из-за их благоприятных молекулярных свойств, включая маленький размер и высокую стабильность. Малозатратная продукция в бактериях и быстрое производство большого количества мишень-специфичных дарпинов делает подход с использованием дарпинов применимым для поиска лекарственных средств. Кроме того, дарпины могут быть с легкостью получены в формах, обладающих множественной специфичностью, что дает возможность направлять эффекторный дарпин на множество рецепторов конкретного органа или ткани с помощью одной молекулы, состоящей из нескольких дарпинов. См., например, Stumpp et al., *Curr Opin Drug Discov Devel*. 10:153-159, 2007; заявки на патенты США № 2009/0082274; и PCT/EP2001/10454.

Конкретные варианты реализации изобретения включают "моноклетку", которые, как правило, используют 10-й домен фибронектина III типа человека (FNfn10) в качестве каркаса для предоставления множества петель поверхности для связывания мишени. FNfn10 представляет собой малый (94 остатка) белок с β -сэндвич структурой, подобной укладке иммуноглобулиновой цепи. Он является высоко стабильным без дисульфидных связей или ионов металла и он может экспрессироваться в правильно уложенной форме на высоком уровне в бактериях. Каркас FNfn10 совместим фактически с любой технологией отображения. См., например, Batori et al., *Protein Eng.* 15:1015-20, 2002; и Wojcik et al., *Nat Struct Mol. Biol.*, 2010; патент США № 6673901.

Антикарины относятся к классу миметиков антител, которые, как правило, синтезируют из человеческих липокалинов, семейства связывающих белков с гипервариабельным участком петли, поддерживаемым структурно жестким каркасным участком. См., например, заявку на патент США № 2006/0058510. Антикарины, как правило, имеют размер примерно 20 кДа. Антикарины характеризуются бочковидной структурой, образованной восьмью антипараллельными β -цепями (стабильный β -бочковидный каркас), которые попарно соединены четырьмя пептидными петлями, и присоединенной α -спиралью. Согласно конкретным аспектам изобретения, в гипервариабельный участок (участки) цепи внесены конформационные изменения для достижения специфического связывания. См., например, Skerra, *FEBS J.* 275:2677-83, 2008, включенный в настоящее изобретение посредством ссылки.

VII. Биологические анализы и аналитические тест-системы для анализа высвобождения лекарственного средства и исследования продукта, диагностика и реагенты.

Также предложены способы биологического анализа, которые относятся к белковым фрагментам AARS и родственным агентам в качестве терапевтических и диагностических реагентов. Примеры включают биологические анализы и аналитические тест-системы, которые позволяют измерить чистоту, биологическую активность, аффинность, растворимость, pH, уровень эндотоксина, и т.д., многие из которых описаны в настоящем изобретении. Также включены анализы, которые обеспечивают кривые зависимости "доза-ответ" и/или обеспечивают один или более параметров на одной или более химической характеристике, биологической характеристике и клинической характеристике. Для белковых агентов также включены способы оценки активности, стабильности, фармакокинетики и иммуногенности выбранного агента. Среди других применений, указанные и другие способы можно применять для тестирования уменьшения объема партии биологических или химических агентов, включая белковые фрагменты AARS, антитела, связывающие агенты, полинуклеотиды, а также антисмысловые агенты и векторы и другие, описанные в настоящем изобретении.

Конкретные варианты реализации изобретения включают применение анализов биоаффинности. Такие анализы можно применять для оценки аффинности связывания, например, между белковым фрагментом AARS и клеточным партнером по связыванию или между белковым фрагментом AARS и антителом. Аффинность связывания также можно измерить между белковым фрагментом AARS и предполагаемым связывающим агентом, таким как соединение-кандидат или "перспективное" исследуемое соединение (например, низкомолекулярный модулятор AARS) или между клеточным партнером по связыванию AARS и исследуемым соединением-кандидатом или перспективным исследуемым соединением. Конкретные типичные анализы аффинности связывания могут использовать анализы на основе твердофазного ИФА, как описано в настоящем изобретении и известно в данной области техники. В конкрет-

ных анализах используется высокоэффективная хроматография связывания с рецептором (см., например, Roswall et al., *Biologicals*. 24:25-39, 1996). Согласно другим типичным анализам аффинности связывания можно применять методы на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Примеры включают технологии компании BIAcore, некоторые из которых объединяют метод на основе SPR с микрофлюидной системой для наблюдения за молекулярными взаимодействиями в реальном времени при концентрациях, варьирующих от пМ до мМ. Также включены анализы KINEXA™, которые обеспечивают точные измерения специфичности связывания, аффинности связывания и кинетики связывания/констант скорости.

Конкретные варианты реализации изобретения относятся к иммунологическим анализам для оценки или оптимизации иммуногенности белковых агентов. Примеры включают клеточные анализы человека *ex vivo* и иммуноферментные анализы *in vitro* для получения полезной информации относительно потенциальной иммуногенности терапевтического белка. Анализы клеточного ответа *ex vivo* можно применять, например, для воспроизведения клеточной кооперации между антиген-презентирующими клетками (АПК) и Т-клетками и, таким образом, измерения активации Т-клеток после контакта с интересующим белком. Конкретные ферментативные анализы *in vitro* могут использовать коллекцию рекомбинантных молекул HLA-DR, охватывающих значительную часть подходящей человеческой популяции, и могут включать автоматизированные иммуноферментные анализы для оценки связывания пептидов (образованных в результате фрагментации терапевтического белка) с молекулами HLA-DR. Также включены способы снижения иммуногенности выбранного белка, например, с использованием указанных и связанных способов для идентификации и последующего удаления или изменения одного или более Т-клеточных эпитопов белкового агента.

Также предложены способы анализа биологического высвобождения (например, клеточные анализы) для измерения параметров, таких как значения специфической биологической активности, включая неканонические виды биологической активности и цитотоксичность. Конкретные специфические биологические анализы включают, например, клеточные анализы, в которых используется клеточный партнер по связыванию (например, рецептор клеточной поверхности), выбранный белковый фрагмент AARS, который функционально связан с индикатором, таким как флуоресцентный или люминесцентный индикатор неканонической биологической активности, описанный в настоящем изобретении.

Например, конкретные варианты реализации изобретения включают клетку, которая содержит рецептор клеточной поверхности или его внеклеточную часть, которая связывается с белковым фрагментом AARS, где указанная клетка содержит детектор или индикатор. Также включены биологические анализы *in vivo* для характеристики фармакокинетики агента, такого как полипептид AARS или антитело, в которых, как правило, используются трансгенные мыши или другие млекопитающие (см., например, Lee et al., *The Journal of Pharmacology*. 281:1431-1439, 1997). Примеры биологических анализов на основе цитотоксичности включают анализы высвобождения (например, анализы высвобождения хрома или европия для оценки апоптоза; см., например, von Zons et al., *Clin Diagn Lab Immunol*, 4:202-207, 1997), среди других анализов, позволяющих оценивать цитотоксичность белковых фрагментов AARS для получения кривых зависимости "доза-ответ", для сравнения партий продукта или анализа других свойств, связанных с получением одобрения различных органов управления, таких как Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (FDA).

Такие анализы можно применять, например, для получения кривой зависимости "доза-ответ" для выбранного белкового фрагмента AARS или другого агента, и/или для сравнения кривых зависимости "доза-ответ" различных партий белков или других агентов. Кривая зависимости "доза-ответ" представляет собой график зависимости X от Y, связывающий величину стрессорного агента с ответом рецептора; где указанный ответ может представлять собой физиологический или биохимический ответ, например, неканоническую биологическую активность в клетке *in vitro* или в клетке или ткани *in vivo*, терапевтически эффективное количество, измеренное *in vivo* (например, измеренное на основе EC₅₀) или смертность, измеренную *in vitro* или *in vivo* (например, клеточную гибель, гибель организма). Смертность обычно выражают как LD₅₀, статистически определенная дозы, которая является летальной для 50% смоделированной популяции, но также может обозначаться как LC₀₁ (летальная доза для 1% анализируемой популяции животных), LC₁₀₀ (летальная доза для 100% анализируемой популяции животных) или LC_{LO} (минимальная доза, вызывающая летальность). Почти все желательные эффекты или конечные точки можно охарактеризовать таким образом.

Измеренную дозу для кривой зависимости "доза-ответ", как правило, наносят на ось X и ответ наносят на ось Y. Чаще ось X наносят логарифм дозы, что наиболее часто приводит к получению сигмоидальной кривой с крутым изгибом в средней части. Уровень отсутствия наблюдаемого эффекта (по observable effect level, NOEL) относится к минимальной экспериментальной дозе, при которой не наблюдается подающегося измерению эффекта, и пороговая доза относится к первой точке на графике, показывающей ответ выше нуля. Как правило, для более сильных лекарственных средств получают более крутые кривые зависимости "доза-ответ". Для многих лекарственных средств желательные эффекты наблюдаются при дозах, немного превышающих пороговую дозу, часто из-за того, что более низкие дозы являются относительно неэффективными, а более высокие дозы приводят к нежелательным побочным

эффектам. Кривые зависимости "доза-ответ", построенные для анализов *in vivo*, при желании могут характеризоваться такими значениями, как мкг/кг, мг/кг или г/кг массы тела.

Для сравнения партий может быть полезно рассчитывать коэффициент вариации (CV) между различными кривыми зависимости "доза-ответ" для различных партий (например, между различными сериями белковых фрагментов AARS, антител или других агентов), отчасти благодаря тому, что CV позволяет сравнивать наборы данных с различными единицами или данных, полученных различными способами. Например, согласно конкретным типичным вариантам реализации изобретения CV между двумя или тремя или более различными партиями белковых фрагментов AARS или других агентов составляет меньше примерно 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% для 4, 5, 6, 7 или 8 точек кривой дозирования. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения кривую зависимости "доза-ответ" оценивают для клеточного анализа, и показатель указанного анализа относится к повышению или снижению выбранной неканонической активности белкового фрагмента AARS. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения кривую зависимости "доза-ответ" измеряли для анализа высвобождения из клеток или на животной модели (например, мышинной модели), и показатель указанного анализа относится к клеточной гибели или смерти животного. Другие варианты очевидны специалистам в данной области техники.

VIII. Системы экспрессии и очистки.

Варианты реализации настоящего изобретения включают способы и связанные композиции для экспрессии и очистки белковых фрагментов AARS или других агентов на основе полипептидов согласно изобретению. Такие рекомбинантные полипептиды AARS могут быть легко получены с использованием стандартных протоколов, описанных, например, в Sambrook, et al. (1989, выше), в частности, разделах 16 и 17; Ausubel et al. (1994, выше), в частности, главах 10 и 16; и Coligan et al., *Current Protocols in Protein Science* (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1997), в частности, главах 1, 5 и 6. В качестве одного общего примера, полипептиды AARS могут быть получены способом, включающим один или более из этапов: (a) получения конструкции, содержащей полинуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид AARS и которая функционально связана с регуляторным элементом; (b) введения конструкции в клетку хозяина; (c) культивирования клетки-хозяина для экспрессии полипептида AARS; и (d) выделения полипептида AARS из клетки-хозяина.

Полинуклеотиды AARS описаны в другой части настоящего изобретения. Для экспрессии желаемого полипептида можно встраивать нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид или его функциональный эквивалент, в соответствующий вектор экспрессии, т.е. вектор, который содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции встроенной кодирующей последовательности. Способы, хорошо известные специалистам в данной области техники, можно применять для конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательности, кодирующие интересующий полипептид, и соответствующие элементы контроля транскрипции и трансляции. Указанные способы включают технологии получения рекомбинантной ДНК *in vitro*, синтетические методы и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Такие методы описаны в источнике Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1989).

Различные системы вектор экспрессии/хозяин известны и могут применяться для включения и экспрессии полинуклеотидных последовательностей. Указанные системы включают, но не ограничиваются перечисленными: микроорганизмы, такие как бактерия, трансформированная рекомбинантным бактериофагом, плазмидные или космидные векторы экспрессии ДНК; дрожжи, трансформированные дрожжевыми векторами экспрессии; системы клеток насекомых, инфицированных вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусом); системы растительных клеток, трансформированные вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV) или бактериальными векторами экспрессии (например, плазмидами Ti или pBR322); или системы клеток животных, включая системы клеток млекопитающих и, более конкретно, человека.

"Контрольные элементы" или "регуляторные последовательности", присутствующие в векторе экспрессии, представляют собой такие нетранслируемые участки вектора (энхансеры, промоторы, 5'- и 3'-нетранслируемые участки), которые взаимодействуют с белками клетки-хозяина для осуществления транскрипции и трансляции. Такие элементы могут отличаться по своей силе и специфичности. В зависимости от используемой векторной системы и хозяина может использоваться любое количество подходящих элементов транскрипции и трансляции, включая конститутивные и индуцибельные промоторы. Например, при клонировании в бактериальных системах можно применять индуцибельные промоторы, такие как гибридный промотор *lacZ* фагмиды PBLUESCRIPT (Stratagene, Ла Джола, Калифорния) или плазмиды PSORT1 (Gibco BRL, Гейтерсбург, Мэриленд) и т.п. В системах клеток млекопитающих промоторы из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих в целом являются предпочтительными. При необходимости получения клеточной линии, которая содержит множество копий последовательности, кодирующей полипептид, предпочтительно использовать векторы на основе SV40 или EBV с соответствующим селективным маркером.

В бактериальных системах количество векторов экспрессии может быть выбрано в зависимости от предполагаемого применения экспрессированного полипептида. Например, в случае необходимости

больших количеств можно применять векторы, направленные на высокий уровень экспрессии слитых белков, которые с легкостью могут быть очищены. Такие векторы включают, но не ограничиваются перечисленными: мультифункциональные векторы клонирования и экспрессии *E.coli*, такие как BLUESCRIPT (Stratagene), в которых последовательность, кодирующая интересующий полипептид, может быть лигирована в вектор в рамке с последовательностями для amino-концевого Met и последующими 7 остатками β -галактозидазы, таким образом, что продуцируется слитый белок; векторы pIN (Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 264:5503, 5509 (1989)); и т.п. Также можно применять векторы pGEX (Promega, Мэдисон, Висконсин) для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-S-трансферазой (GST). В целом такие слитые белки являются растворимыми и могут с легкостью быть очищены из лизированных клеток путем абсорбции на глутатион-агарозные гранулы с последующим вымыванием в присутствии свободного глутатиона. Белки, созданные в таких системах, могут быть сконструированы для включения гепарина, тромбина или сайтов расщепления протеазой фактором ХА, таким образом, что клонированный интересующий полипептид может самопроизвольно высвободиться из фрагмента GST.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения можно применять системы экспрессии на основе *E.coli* (см., например, Structural Genomics Consortium et al., Nature Methods. 5:135-146, 2008). Указанные и связанные варианты реализации изобретения могут основываться частично или полностью на лигазно-независимом клонировании (LIC) для продукции подходящего вектора экспрессии. Согласно конкретному варианту реализации изобретения экспрессию белка можно контролировать с помощью РНК-полимеразы T7 (например, серия векторов pET). Согласно указанным и связанным вариантам реализации изобретения может использоваться экспрессия в хозяйском штамме BL21(DE3), содержащем лизоген λ DE3 BL21, который поддерживает T7-опосредованную экспрессию и не имеет протеаз lon и ompT, для улучшения стабильности белка-мишени. Также включена экспрессия хозяйских штаммов, содержащих плазмиды, кодирующие tРНК, которые редко используются в *E.coli*, такие как штаммы ROSETTA™ (DE3) и Rosetta 2 (DE3). Лизис клеток и обработку образца также можно улучшить с использованием реагентов, которые продаются под торговыми марками нуклеаза BENZONASE® и реагент для белковой экстракции BUGBUSTER®. Для клеточных культур, самоиндуцирующая среда может улучшать эффективность многих систем экспрессии, включая высокоэффективные системы экспрессии. Среда указанного типа (например, система самоиндукции OVERNIGHT EXPRESS™) постепенно вызывает экспрессию белка путем метаболического сдвига, без добавления искусственных индуцирующих агентов, таких как IPTG. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения используются гексагистициновые метки (такие как метки, которые продаются под торговой маркой гибридов HIS-TAG®), с последующей очисткой с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла (IMAC), или связанных методов. Однако согласно конкретным аспектам изобретения, белки клинической степени чистоты могут быть изолированы из телец включения *E.coli*, с использованием или без использования аффинной метки (см., например, Shimp et al., Protein Expr Purif. 50:58-67, 2006). В качестве другого примера, согласно конкретным вариантам реализации изобретения можно применять индуцируемые Холодовым шоком высокоэффективные системы продукции *E.coli*, так как повышенная экспрессия белков в *Escherichia coli* при низкой температуре улучшает растворимость и стабильность (см., например, Qing et al., Nature Biotechnology. 22:877-882, 2004).

Также включены системы бактериальной ферментации с большой плотностью. Например, культивирование клеток *Ralstonia eutropha* при высокой плотности обеспечивает продукцию белка при плотности клеток больше 150 г/л и экспрессию рекомбинантных белков в титрах, превышающих 10 г/л.

В дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* может использоваться ряд векторов, содержащих конститутивные или индуцибельные промоторы, такие как альфа-фактор, алкогольоксидаза и PGH. Обзоры см. в источниках Ausubel et al. (выше) и Grant et al., Methods Enzymol. 153:516-544 (1987). Также включены системы экспрессии *Pichia pandoris* (см., например, Li et al., Nature Biotechnology. 24, 210-215, 2006; и Hamilton et al., Science, 301:1244, 2003). Конкретные варианты реализации изобретения включают дрожжевые системы, которые сконструированы для селективного гликозилирования белков, включая дрожжи, которые имеют гуманизированные пути N-гликозилирования, и другие (см., например, Hamilton et al., Science. 313:1441-1443, 2006; Wildt et al., Nature Reviews Microbiol. 3:119-28, 2005; и Gerngross et al., Nature-Biotechnology. 22:1409-1414, 2004; патенты США № 7629163; 7326681 и 7029872). Исключительно в качестве примера, рекомбинантные дрожжевые культуры можно растить в колбах Фернбаха или ферментерах на 15L, 50L, 100L и 200L и т.д.

В случаях, когда используются растительные векторы экспрессии, экспрессия последовательности, кодирующей полипептиды, может быть запущена любым из ряда промоторов. Например, можно применять вирусные промоторы, такие как промоторы 35S и 19S CaMV, отдельно или в комбинации с омега-лидерной последовательностью из вируса табачной мозаики TMV (Takamatsu, EMBO J. 6:307-311 (1987)). В альтернативном варианте можно применять растительные промоторы, такие как малая субъединица RUBISCO или промоторы теплового шока (Coruzzi et al., EMBO J. 3:1671-1680 (1984); Broglie et al., Science 224:838-843 (1984); и Winter et al., Results Probl. Cell Differ. 17:85-105 (1991)). Указанные кон-

струкции могут быть введены в растительные клетки путем непосредственной трансформации ДНК или патоген-опосредованной трансфекции. Указанные методы описаны в ряде общедоступных обзоров (см., например, Hobbs in McGraw Hill, Yearbook of Science and Technology, p. 191-196 (1992)).

Для экспрессии целевого полипептида также может использоваться система на основе насекомых. Например, в одной указанной системе, вирус ядерного полиэдроза (AcNPV) *Autographa californica* используется в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов в клетках *Spodoptera frugiperda* или в клетках *Trichoplusia*. Последовательности, кодирующие полипептид, можно клонировать в заменимый участок вируса, такой как ген полиэдрина, и помещать под контроль промотора полиэдрина. Успешное встраивание кодирующей полипептид последовательности приводит к инактивации гена полиэдрина и продукции рекомбинантного вируса, у которого отсутствует белок оболочки. Рекомбинантные вирусы могут затем использоваться для инфицирования, например, клеток *S. frugiperda* или клеток *Trichoplusia*, в которых можно экспрессировать интересующий полипептид (Engelhard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:3224-3227 (1994)). Также включены системы экспрессии бакуловируса, включая системы, которые используют клетки SF9, SF21 и T. ni (см., например, Murphy and Pivnick-Worms, Curr Protoc Protein Sci. Chapter 5:Unit5.4, 2001). Системы насекомых могут обеспечивать пост-трансляционные модификации, подобные системам млекопитающих.

В целом доступен ряд систем экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих на основе вирусов. Например, в случаях, когда используется аденовирус в качестве вектора экспрессии, последовательности, кодирующие интересующий полипептид, можно лигировать в комплекс транскрипции/трансляции аденовируса, состоящий из позднего промотора и тройной лидерной последовательности. Встраивание в заменимый участок E1 или E3 вирусного генома может использоваться для получения жизнеспособного вируса, который способен экспрессировать полипептид в инфицированных клетках-хозяевах (Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:3655-3659 (1984)). Кроме того, можно применять энхансеры транскрипции, такие как энхансер вируса саркомы Рауса (RSV), для повышения экспрессии в хозяйской клетке млекопитающего.

Примеры применимых хозяйских клеточных линий млекопитающих включают линию клеток почки обезьяны CV1, трансформированные SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линию человеческих эмбриональных клеток почки (293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомячка (BHK, ATCC CCL 10); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крыс буфало (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TR1 (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; и клеточную линию гепатомы человека (Hep G2). Другие применимые хозяйские клеточные линии млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR-CHO (Urlaub et al., PNAS USA 77:4216 (1980)); и клеточные линии миеломы, такие как NSO и Sp2/0. Обзор конкретных хозяйских клеточных линий млекопитающих, подходящих для продукции антител, можно найти, например, в источниках Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), p. 255-268. Конкретные предпочтительные системы экспрессии на основе клеток млекопитающих включают системы экспрессии на основе клеток CHO и HEK293. Системы экспрессии млекопитающих могут использовать адгезионные клеточные линии, выращенные, например, на Т-флаконах, роллерных флаконах или клеточных фабриках, или суспензионные культуры, выращенные, например, во вращающихся флаконах на 1 и 5 л, биореакторах с механическим перемешиванием на 5, 14, 40, 100 или 200 л или биореакторах на 20/50 л и 100/200 л WAVE, среди прочего, известных в данной области техники.

Также включены бесклеточные системы экспрессии белков. Согласно указанным и связанным вариантам реализации изобретения как правило, используют очищенную РНК-полимеразу, рибосомы, тРНК и рибонуклеотиды; указанные реагенты могут быть получены путем экстракции из клеток или их клеточной системы экспрессии.

Специфические иницирующие сигналы также можно применять для достижения более эффективной трансляции последовательностей, кодирующих интересующий полипептид. Указанные сигналы включают иницирующий кодон ATG и прилежащие последовательности. В случаях, когда последовательности, кодирующие полипептид, его иницирующий кодон и вышележащие последовательности, встраиваются в соответствующий вектор экспрессии, нет необходимости в дополнительных сигналах контроля транскрипции или трансляции. Однако в случаях, когда встраиваются только кодирующая последовательность или ее части, должны быть обеспечены экзогенные сигналы контроля трансляции, включая иницирующий кодон ATG. Более того, иницирующий кодон должен находиться в правильной рамке считывания для обеспечения трансляции целой встроенной последовательности. Экзогенные элементы трансляции и иницирующие кодоны могут иметь различное происхождение, быть как природными, так и синтетическими. Эффективность экспрессии может быть повышена путем включения энхансеров, которые соответствуют для конкретной используемой клеточной системы, такие как энхан-

серы, описанные в литературе (Scharf. et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162 (1994)).

Кроме того, может быть выбран штамм хозяйских клеток на основе их способности модулировать экспрессию встроенной последовательности или процессировать экспрессируемый белок желаемым образом. Такие модификации полипептида включают, но не ограничиваются перечисленными: пост-трансляционные модификации, такие как ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, присоединение липидов и ацилирование. Пост-трансляционный процессинг, обеспечивающий расщепление "препро" формы белка, может также использоваться для облегчения правильного встраивания, укладки и/или функции. Различные клетки-хозяева, такие как дрожжи, CHO, HeLa, MDCK, HEK293 и W138, кроме бактериальных клеток, которые имеют или даже не имеют специальный клеточный аппарат и характерные механизмы для пост-трансляционной активности, могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессинга чужеродного белка.

Для длительной высокоэффективной продукции рекомбинантных белков стабильная экспрессия в целом является предпочтительной. Например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют интересующий полинуклеотид, могут быть трансформированы с использованием векторов экспрессии, которые могут содержать вирусные орджины репликации и/или эндогенные элементы экспрессии и выбранный маркерный ген в том же или в отдельном векторе. После встраивания вектора клеткам можно позволить расти в течение примерно 1-2 дней в обогащенной питательной среде до их перевода на селективную среду. Целью селективного маркера является подтверждение устойчивости селекции, и его присутствие позволяет рост и репарацию клеток, которые успешно экспрессируют введенные последовательности. Устойчивые клоны стабильно трансформированных клеток можно размножать с использованием методов тканевых культур, соответствующих данному типу клеток. Временная продукция, например, путем временной трансфекции или инфекции, также может использоваться. Типичные системы экспрессии млекопитающих, которые являются подходящими для временной продукции, включают системы на основе клеток HEK293 и CHO.

Любое число систем селекции может использоваться для восстановления трансформированных или трансдуцированных клеточных линий. Указанные включают, но не ограничиваются перечисленными: гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al., *Cell* 11:223-232 (1977)) и аденинфосфорибозинтрансферазы (Lowy et al., *Cell* 22:817-823 (1990)), которые можно применять в tk- или apt-клетках соответственно. Также антиметаболическая устойчивость, устойчивость к антибиотикам или гербицидам может использоваться в качестве основы для селекции; например, dhfr, которая обеспечивает устойчивость к метотрексату (Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:3567-70 (1980)); npt, который обеспечивает устойчивость к аминогликозидам, неомицину и G-418 (Colbere-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1-14 (1981)); и als или pat, которые обеспечивают устойчивость к хлорсульфурону и фосфинотрицинацетилтрансферазе, соответственно (Mungu, выше). Были описанные другие селективные гены, например, trpB, которые позволяют клеткам использовать индол вместо триптофана, или his, который позволяет клеткам использовать гистинол вместо гистидина (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8047-51 (1988)). Применение видимых маркеров приобрело популярность с использованием таких маркеров, как зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP) и другие флуоресцентные белки (например, RFP, YFP), антоцианины, β -глюкуронидаза и ее субстрат GUS и люцифераза и ее субстрат люциферин, которые широко используются не только для идентификации трансформантов, но также для количественной оценки неустойчивой или стабильной экспрессии белка, обеспечиваемой конкретной векторной системой (см., например, Rhodes et al., *Methods Mol. Biol.* 55:121-131 (1995)).

Варианты реализации настоящего изобретения также включают высокоэффективные системы продукции белка или низкоэффективные системы продукции. Согласно конкретным аспектам, можно применять, например, слитые с гексагистидином метки для экспрессии и очистки белка на модифицированных хелатом металла поверхностях скольжения или MagneHis Ni-частицах (см., например, Kwon et al., *BMC Biotechnol.* 9:72, 2009; и Lin et al., *Methods Mol Biol.* 498:129-41, 2009)). Также включены высокоэффективные бесклеточные белковые системы экспрессии (см., например, Sitaraman et al., *Methods Mol Biol.* 498:229-44, 2009). Указанные и связанные варианты реализации изобретения можно применять, например, для получения микрочипов белковых фрагментов AARS, которые могут затем использоваться для скрининга библиотек для идентификации агентов, которые взаимодействуют с белковым фрагментом (фрагментами) AARS.

Различные протоколы для детектирования и измерения экспрессии кодируемых полинуклеотидом продуктов с использованием связывающих агентов или антител, таких как поликлональные или моноклональные антитела, специфические для указанного продукта, известны в данной области техники. Примеры включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), вестерн-иммуноблоттинг, радиоиммунологические анализы (RIA) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS). Эти и другие анализы описаны, среди других источников, в Hampton et al., *Serological Methods, a Laboratory Manual* (1990) и Maddox et al., *J. Exp. Med.* 158:1211-1216 (1983).

Широкое разнообразие меток и методов конъюгации известны специалистам в данной области техники и их можно применять в различных анализах нуклеиновых кислот и аминокислот. Способы получения зондов для меченой гибридизации или ПЦР для выявления последовательности, связанной с по-

линуклеотидами, включают олигомечение, ник-трансляцию, концевое мечение или ПЦР-амплификацию с использованием меченого нуклеотида. В альтернативном варианте последовательности или любые их части можно клонировать в вектор для продукции мРНК-зонда. Указанные векторы, известные в данной области техники, являются коммерчески доступными и можно применять для синтеза РНК-зондов *in vitro* путем добавления соответствующей РНК-полимеразы, такой как T7, T3 или SP6 и меченых нуклеотидов. Указанные процедуры можно проводить использованием различных коммерчески доступных наборов. Подходящие репортерные молекулы или метки, которые можно применять, включают радионуклеотиды, ферменты, флуоресцентные, хемилюминесцентные или хромогенные агенты, а также субстраты, кофакторы, ингибиторы, магнитные частицы и т.п.

Клетки-хозяева, трансформированные интересующей полинуклеотидной последовательностью, могут культивироваться в условиях, подходящих для экспрессии и восстановления белка из клеточной культуры. Согласно конкретному варианту реализации изобретения используется свободная от сыворотки клеточная системы экспрессии. Примеры включают клетки HEK293 и клетки CHO, которые можно растить в бессывороточной среде (см., например, Rosser et al., *Protein Expr. Purif.* 40:237-43, 2005; и патент США № 6210922).

Белок, продуцируемый рекомбинантной клеткой, может секретироваться или содержаться внутри клетки в зависимости от используемой последовательности и/или вектора. Специалистам в данной области техники ясно, что могут быть созданы векторы экспрессии, содержащие полинуклеотиды согласно изобретению, с включением сигнальных последовательностей, которые направляют секрецию закодированного полипептида через мембрану прокариотической или эукариотической клетки. Другие рекомбинантные конструкции можно применять для соединения последовательностей, кодирующих интересующий полипептид, с нуклеотидной последовательностью, кодирующей домен полипептида, который будет облегчать очистку и/или детектирование растворимых белков. Примеры указанных доменов включают расщепляемые или не расщепляемые метки аффинной очистки и эпитопные метки, такие как авидин, FLAG-метки, поли-гистидиновые метки (например, 6xHis), cMyc метки, V5-метки, глутатион-S-трансферазные (GST) метки и другие.

Белок, продуцируемый рекомбинантной клеткой, может быть очищен и охарактеризован в соответствии с различными способами, известными в данной области техники. Типичные системы для проведения очистки белка и анализа чистоты белка, включают жидкостную экспресс-хроматографию белков (ЖЭХБ) (например, системы для ЖЭХБ АКТА и Bio-Rad), жидкостную хроматографию при высоком давлении (ЖХВД) (например, прибор для ЖХВД Beckman and Waters). Типичные химические анализы для очистки включают ионообменную хроматографию (например, Q, S), эксклюзионную хроматографию, солевые градиенты, аффинную очистку (например, Ni, Co, FLAG, мальтоза, глутатион, белок A/G), гель-фильтрацию, обращенно-фазовую, керамическую HYPERD® ионообменную хроматографию и колонки для хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (HIC), среди прочих, известных в данной области техники. Также включены аналитические способы, такие как электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ПААГ-ДСН) (например, окраска Кумасси, окрашивание серебром), иммуноблоттинг, метод Брэдфорда и ELISA, которые можно применять во время любого этапа продукции или процесса очистки, как правило, для измерения чистоты белковой композиции.

Также предложены способы концентрирования белковых фрагментов AARS и получения композиций, содержащих концентрированные растворимые белки. Согласно различным аспектам, такие концентрированные растворы полипептидов AARS могут содержать белки в концентрации, составляющей примерно 5 мг/мл или примерно 8 мг/мл или примерно 10 мг/мл; примерно 15 мг/мл или примерно 20 мг/мл.

Согласно одному аспекту указанные композиции могут являться по существу монодисперсными, что означает, что указанные композиции, содержащие полипептид AARS, существуют в основном (т.е. по меньшей мере примерно на 90% или более) в форме, демонстрирующей одну очевидную молекулярную массу при анализе, например, с помощью эксклюзионной хроматографии, динамического рассеяния света или аналитического ультрацентрифугирования.

Согласно другому аспекту, указанные композиции являются чистыми (на основе белка) по меньшей мере примерно на 90% или согласно некоторым аспектам по меньшей мере примерно на 95% чистыми, или согласно некоторым вариантам реализации изобретения по меньшей мере на 98% чистыми. Чистоту можно определять с помощью любого стандартного аналитического способа, известного в данной области техники.

Согласно другому аспекту, содержание высокомолекулярных агрегатов в указанных композициях составляет меньше примерно 10% от общего количества присутствующего белка, или согласно некоторым вариантам реализации изобретения содержание высокомолекулярных агрегатов в указанных композициях составляет меньше примерно 5%, или согласно некоторым аспектам, содержание высокомолекулярных агрегатов в указанных композициях составляет меньше примерно 3%, или согласно некоторым вариантам реализации изобретения содержание высокомолекулярных агрегатов составляет меньше примерно 1%. Содержание высокомолекулярных агрегатов можно определить с помощью различных аналитических методов, включая, например, эксклюзионную хроматографию, динамическое рассеяние света или аналитическое ультрацентрифугирование.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, как отмечено в настоящем изобретении, содержание эндотоксина в композициях полипептида AARS составляет меньше примерно 10 ЕЭ/мг полипептида AARS или меньше примерно 5 ЕЭ/мг полипептида AARS, меньше примерно 3 ЕЭ/мг полипептида AARS или меньше примерно 1 ЕЭ/мг полипептида AARS.

Примеры методов концентрирования, рассмотренных в настоящем изобретении, включают лиофилизацию, которую, как правило, используют, когда раствор содержит малорастворимые компоненты, отличные от интересующего белка. Лيوфилизацию часто осуществляют после проведения ЖХВД, и с ее помощью можно удалить большую часть или все летучие компоненты из смеси. Также предусмотрены методы ультрафильтрации, которые, как правило, используют одну или более селективную проницаемую мембрану для концентрации белкового раствора. Мембрана позволяет прохождение воды и малых молекул, но не пропускает белок; раствор может пропускаться через мембрану с помощью механического насоса, давления газа или центрифугирования и других методов.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения реагенты, белковые фрагменты AARS или родственные агенты (например, антитела) являются чистыми по меньшей мере примерно на 90%, по результатам измерения в соответствии со стандартными методами в данной области техники. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения таким как диагностические композиции или конкретные терапевтические композиции, композиции, содержащие AARS, согласно настоящему изобретению, являются чистыми по меньшей мере примерно на 95%. Согласно конкретному варианту реализации изобретения таким как терапевтические или фармацевтические композиции, композиции, содержащие AARS, согласно настоящему изобретению, являются чистыми по меньшей мере примерно на 97% или 98%, или 99%. Согласно другим вариантам реализации изобретения таким как применение в качестве эталонных реагентов или реагентов для исследований, белковые фрагменты AARS могут быть менее чистыми и могут являться чистыми по меньшей мере примерно на 50, 60, 70 или 80%. Можно измерять общую чистоту или чистоту на основе выбранных компонентов, таких как другие белки, например, чистоту на основе белка.

Очищенные белковые фрагменты AARS также могут быть охарактеризованы в соответствии с их биологическими характеристиками. Примеры включают аффинность связывания или кинетику связывания с выбранным лигандом (например, клеточным партнером по связыванию белкового фрагмента AARS, таким как рецептор клеточной поверхности или его внеклеточный домен) и присутствие уровня одной или более традиционной или неканонической биологической активности, описанной в настоящем изобретении. Аффинность связывания и кинетику связывания можно измерить в соответствии с различными способами, известными в данной области техники, такими как Biacore® и связанные технологии, которые используют поверхностный плазмонный резонанс (SPR), оптическое явление, которое обеспечивает детектирование немеченых интерактантов в реальном времени. Биосенсоры на основе SPR могут применяться для определения активной концентрации, скрининга и исследования на предмет аффинности и кинетики. Присутствие уровня одной или более традиционных или нетрадиционных биологических видов активности можно измерить в соответствии с клеточными анализами, включая анализы, которые используют клеточный партнер по связыванию (например, рецептор клеточной поверхности), выбранный из белкового фрагмента AARS, который функционально сопряжен с выявляемым агентом или индикатором, таким как флуоресцентный или люминесцентный индикатор неканонической биологической активности, описанный в настоящем изобретении.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения как отмечено выше, композиции, содержащие полипептид AARS, являются по существу приблизительно свободными от эндотоксина, например, примерно на 95% свободными от эндотоксина, предпочтительно, примерно на 99% свободными от эндотоксина, и более предпочтительно, примерно на 99,99% свободными от эндотоксина. Присутствие эндотоксинов можно выявить в соответствии со стандартными методами, известными в данной области техники, как описано в настоящем изобретении. Согласно конкретному варианту реализации изобретения композиции, содержащие AARS, получены из эукариотической клетки, такой как клетка млекопитающего или клетка человека, в по существу свободной от сыворотки среде.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения композиции, содержащие полипептид AARS, содержат меньше примерно 10% (по массе) высокомолекулярных агрегатов или меньше примерно 5% (по массе) высокомолекулярных агрегатов или меньше примерно 2% (по массе) высокомолекулярных агрегатов или меньше примерно 1% (по массе) высокомолекулярных агрегатов.

Также предусмотрены способы анализа и тест-системы на основе белка, которые можно применять для оценки, например, чистоты белка, размера, растворимости и степени агрегации, а также другие характеристики. Чистоту белка можно оценить несколькими путями. Например, чистоту можно оценить на основе первичной структуры, структуры высоких порядков, размера, заряда, гидрофобности и гликозилирования. Примеры способов проведения оценки первичной структуры включают N- и C-концевое секвенирование и пептид-картирование (см., например, Allen et al., *Biologicals*. 24:255-275, 1996)). Примеры способов проведения оценки структуры высоких порядков включают круговой дихроизм (см., например, Kelly et al., *Biochim Biophys Acta*. 1751:119-139, 2005), флуоресцентную спектроскопию (см., например, Meagher et al., *J. Biol. Chem.* 273:23283-89, 1998), FT-IR, кинетику водородно-дейтериевого обмена в

амидах, дифференциальную сканирующую калориметрию, ЯМР-спектроскопию, иммунореактивность с чувствительными к конформации антителами. Структуры высоких порядков также можно оценивать как функцию различных параметров, таких как pH, температура или добавленные соли. Примеры способов осуществления оценки характеристик белка, таких как размер, включают аналитическое ультрацентрифугирование и эксклюзионную ЖХВД (ЭХ-ЖХВД), и типичные способы для измерения заряда включают ионообменную хроматографию и изоэлектрическое фокусирование. Гидрофобность можно оценить, например, с помощью обращенно-фазовой ЖХВД и хроматографии гидрофобных взаимодействий ЖХВД. Гликозилирование может влиять на фармакокинетику (например, клиренс), конформацию или стабильность, связывание с рецептором и функцию белка и может быть оценено, например, с помощью масс-спектрометрии и спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Как отмечено выше, конкретные варианты реализации изобретения включают применение ЭХ-ЖХВД для оценки характеристик белка, таких как чистота, размер (например, гомогенность размера) или степень агрегации, и/или для очистки белков, и другие применения. Эксклюзионная хроматография (ЭХ), также включая гель-фильтрационную хроматографию (ГФХ) и гель-проникающую хроматографию (ГПХ), относится к хроматографическому методу, в котором молекулы в растворе разделяются в пористом материале на основе их размера, или более конкретно, их гидродинамического объема, коэффициента диффузии и/или свойств поверхности. Процесс в целом используется для разделения биологических молекул и для определения молекулярных масс и распределения молекулярных масс полимеров. Как правило, биологический образец или белковый образец (такой как белковый экстракт, полученный в соответствии со способами экспрессии белка, предложенными в настоящем изобретении и известными в данной области техники) наносится на выбранную колонку для эксклюзионной хроматографии с определенной неподвижной фазой (пористым материалом), предпочтительно фазой, которая не взаимодействует с белками в образце. Согласно конкретным аспектам изобретения, неподвижная фаза состоит из инертных частиц, упакованных в плотную трехмерную матрицу внутри стеклянной или стальной колонки. Подвижная фаза может представлять собой чистую воду, водный буфер, органический растворитель или их смесь. Частицы неподвижной фазы, как правило, имеют маленькие поры и/или каналы, которые только позволяют входить молекулам ниже конкретного размера. Большие частицы, таким образом, исключаются из указанных пор и каналов и их ограниченное взаимодействие с неподвижной фазой приводит к их вымыванию в виде "полностью исключенного" пика в начале эксперимента. Более мелкие молекулы, которые могут вестись в поры, удаляются из текущей подвижной фазы, и время, которое они проводят иммобилизованными в порах неподвижной фазы, зависит отчасти от того, как далеко они проникают в поры. Их удаление из тока подвижной фазы приводит к тому, что они дольше вымываются из колонки, что приводит к разделению частиц на основе различий в их размере. Конкретная колонка для эксклюзионной хроматографии имеет диапазон молекулярных масс, которые могут разделяться. В целом молекулы, которые больше верхнего предела, не улавливаются неподвижной фазой, молекулы, которые меньше нижнего предела, полностью заходят в твердую фазу и вымываются в виде одного "бэнда" и молекулы, находящиеся в пределах диапазона, вымываются с разными скоростями, которые определяются их свойствами, такими как гидродинамический объем. Примеры указанных способов, используемых на практике для фармацевтических белков, можно найти в источнике Bruner et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 15: 1929-1935, 1997.

Чистота белка для клинического применения также обсуждается, например, Аницетти (Anicetti et al., *Trends in Biotechnology*. 7:342-349, 1989). Более поздние методы анализа чистоты белка включают, но не ограничиваются перечисленными: LabChip GXII, автоматизированную платформу для быстрого анализа белков и нуклеиновых кислот, которая обеспечивает высокоэффективный анализ титра, распределение по размеру и анализ чистоты белков. Согласно конкретным неограничивающим вариантам реализации изобретения белки клинической степени чистоты, такие как белковые фрагменты и антитела, могут быть получены путем использования комбинирования хроматографических материалов по меньшей мере в двух независимых этапах, среди других способов (см., например, *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols*. Vol. 308, Eds., Smales and James, Humana Press Inc., 2005). Как правило, белковые агенты (например, белковые фрагменты AARS, антитела, связывающие агенты) и другие агенты (например, антисмысловые, РНКи, низкомолекулярные соединения) по существу являются свободными от эндотоксинов, как измерено в соответствии со способами, известными в данной области техники и, описанными в настоящем изобретении.

Также включены способы анализа растворимости белков. Такие анализы можно применять, например, для определения оптимальных условий для роста и очистки для рекомбинантной продукции, для оптимизации выбора буфера (буферов) и для оптимизации выбора белковых фрагментов AARS или их вариантов. Растворимость или агрегацию можно оценить в соответствии с различными параметрами, включая температуру, pH, соли и присутствие или отсутствие других добавок. Примеры скрининговых анализов растворимости включают, но не ограничиваются перечисленными: способ измерения растворимости белка на основе микропланшетов с использованием степени прозрачности или других измерений в качестве конечной точки, высокоэффективные анализы для анализа растворимости очищенных рекомбинантных белков (см., например, Stenvall et al., *Biochim Biophys Acta*. 1752:6-10, 2005), анализы,

которые используют структурную комплементарность генетического маркерного белка для отслеживания и измерения укладки белка и растворимости *in vivo* (см., например, Wigley et al., *Nature Biotechnology*. 19:131-136, 2001) и электрохимический скрининг растворимости рекомбинантных белков в *Escherichia coli* с использованием сканирующей электрохимической микроскопии (scanning electrochemical microscopy, SECM) (см., например, Nagamine et al., *Biotechnology and Bioengineering*. 96:1008-1013, 2006), среди других способов. Белковые фрагменты AARS, обладающие повышенной растворимостью (или пониженной агрегацией) могут быть идентифицированы или выбраны в соответствии со стандартными методами в данной области техники, включая простые анализы *in vivo* растворимости белка (см., например, Maxwell et al., *Protein Sci.* 8:1908-11, 1999).

Растворимость и агрегацию белка можно измерить с помощью методов на основе динамического рассеяния света. Агрегация представляет собой общий термин, который включает несколько типов взаимодействий или характеристик, включая растворимость/нерастворимость, ковалентные/нековалентные взаимодействия, обратимые/необратимые взаимодействия и нативное/денатурированное состояния. Для способов терапии с использованием белков присутствие агрегатов, как правило, считается нежелательным, из-за того, что агрегаты могут вызывать иммуногенную реакцию (например, малые агрегаты) или могут вызывать неблагоприятные реакции на введение (например, частиц). Динамическое рассеяние света относится к методу, который может использоваться для определения профиля распределения по размерам малых частиц в суспензии или полимерах, таких как белки в растворе. Указанный метод, также называемый фотонно-корреляционной спектроскопией (PCS) или квазиупругим рассеянием света (QELS), использует рассеянный свет для измерения скорости диффузии белковых частиц. Колебания интенсивности рассеивания могут наблюдаться из-за броуновского движения молекул и частиц в растворе. Указанные данные о движении могут стандартным способом обрабатываться для выведения распределения по размерам для образца, где указанный размер описывается радиусом Стокса или гидродинамическим радиусом белковой частицы. Гидродинамический размер зависит как от массы, так и от формы (конформации). Динамическое рассеивание может выявлять присутствие очень малых количеств агрегированного белка (<0,01% по массе), даже в образцах, которые содержат большой диапазон масс. Его также можно использовать для сравнения стабильности различных лекарственных форм, включая, например, способы применения, которые основаны на наблюдении изменений в реальном времени при повышенных температурах. Соответственно, конкретные варианты реализации изобретения включают применение динамического рассеяния света для анализа растворимости и/или присутствия агрегатов в образце, который содержит белковый фрагмент AARS, антитело или другой агент согласно изобретению.

IX. Диагностические способы и композиции.

AARS-агенты, такие как белковые фрагменты AARS, полинуклеотиды AARS и антитела и другие связывающие агенты, описанные в настоящем изобретении, могут применяться в диагностических анализах и диагностических композициях. Включены биохимические, гистологические и клеточные способы и композиции, среди прочего.

Указанные и связанные варианты реализации изобретения включают детектирование последовательности (последовательностей) полинуклеотида AARS или соответствующей последовательности (последовательностей) полипептида AARS или его частей, одного или более новых идентифицированных белковых фрагментов AARS, также называемых полипептидами AARS. Например, конкретные аспекты включают детектирование последовательности (последовательностей) полинуклеотида AARS или соответствующей последовательности (последовательностей) полипептида или его частей, одного или более новых идентифицированных сплайс-вариантов AARS, и/или одной или более границ сплайсинга указанных сплайс-вариантов. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения полинуклеотид или соответствующая последовательность (последовательности) полипептида по меньшей мере одной из границ сплайсинга является уникальной для указанного конкретного сплайс-варианта AARS.

Также предложено непосредственное детектирование белковых фрагментов AARS, включая сплайс-варианты, протеолитические фрагменты и другие. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, присутствие или уровень одного или более новых идентифицированных белковых фрагментов AARS связано или коррелирует с одним или более клеточным типом или состоянием клеток. Таким образом, присутствие или уровень полипептида или полинуклеотида AARS можно применять для различения разных типов клеток или разных состояний клеток.

Присутствие или уровень белковых фрагментов AARS или родственных им полинуклеотидов может выявляться в соответствии с основанными на полинуклеотидах и/или полипептидах диагностическими методами, описанными в настоящем изобретении и известными в данной области техники.

Согласно конкретным аспектам, белковые фрагменты AARS, антитела или полинуклеотиды AARS можно применять как часть сопутствующего диагностического способа, обычно, для предсказания благоприятного ответа у субъекта или популяции субъектов на конкретное медицинское лечение. Например, конкретный терапевтический агент AARS (например, белковый фрагмент, антисмысловой агент, РНК-агент, антитело, связывающий агент) можно идентифицировать как подходящий для субъекта или конкретной популяции субъектов на основе того, будет ли субъект (субъекты) иметь один или более выбранных биомаркеров для конкретного заболевания или состояния. Примеры биомаркеров включают

сывороточные/тканевые маркеры, а также маркеры, которые могут быть идентифицированы с помощью методов медицинской визуализации. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения природный белковый фрагмент AARS (или соответствующий полинуклеотид) может сам обеспечивать сывороточный и/или тканевой биомаркер, который можно использовать для измерения результата лекарственного средства или оценки целесообразности применения указанного лекарственного средства у конкретных субъектов или в конкретных популяциях субъектов. Согласно конкретным аспектам изобретения, идентификация эталонной последовательности полипептида или полинуклеотида AARS может включать характеристику дифференциальной экспрессии указанной последовательности, как в выбранном субъекте, так и в выбранной ткани, или другим способом, описанным в настоящем изобретении и известным в данной области техники.

Конкретные способы, предложенные в настоящем изобретении, основываются на различной экспрессии полипептида или полинуклеотида AARS для исследования состояния или стадии клетки, ткани или субъекта, и для различения их от других клеток, тканей или субъектов. Неограничивающие примеры включают способы выявления присутствия или уровня полипептида или полинуклеотида AARS в биологическом образце для различения клеток или тканей разных видов, клеток разных тканей или органов, стадий клеточного развития, например, клетками новорожденного и взрослого организма, стадий дифференцировки клеток, состояний, таких как здоровое, нездоровое и требующее лечения состояние, внутриклеточных и внеклеточных фракций, а также первичных клеточных культур, таких как иммортализованные клеточные культуры.

Дифференциальная экспрессия включает статистически значимое различие уровней экспрессии одного или более генов эталонной последовательности полинуклеотида или полипептида AARS по сравнению с уровнем экспрессии той же последовательности в соответствующем контроле. Статистически значимое различие может относиться либо к повышению, либо к снижению уровня экспрессии, при измерении на основе уровня РНК, уровня белка, функции белка или любого другого подходящего способа измерения экспрессии гена, такого как способы измерения, описанные в настоящем изобретении. Также включено сравнение полинуклеотида или полипептида AARS согласно изобретению и последовательности полноразмерной цитозольной или митохондриальной AARS или цитозольной или митохондриальной AARS дикого типа, как правило, такого же или соответствующего типа. Дифференциальная экспрессия может быть выявлена с помощью различных способов, известных в данной области техники и описанных в настоящем изобретении, включая способы на основе полинуклеотидов и полипептидов, такие как ПЦР в реальном времени, вычитающая гибридизация, полинуклеотидные и полипептидные чипы, и другие.

Результат, как правило, называется статистически значимым, если он с низкой вероятностью является случайным. Уровень значимости теста или результата обычно относится к анализу частоты принятия статистической гипотезы. В простых случаях, статистическая значимость может быть определена как вероятность принятия решения отвержения нулевой гипотезы, когда указанная нулевая гипотеза является в действительности справедливой (решение, известное как ошибка I типа, "ложно положительное определение"). Указанное решение часто принимается на основе р-значения: если р-значение меньше уровня значимости, то нулевая гипотеза отвергается. Чем меньше р-значение, тем более значимым является результат. Коэффициенты Бейеса также можно применять для определения статистической значимости (см., например, Goodman S., *Алл Intern Med* 130:1005-13, 1999).

В более сложных, но с практической точки зрения важных случаях, уровень значимости критерия или результата может относиться к анализу, в котором вероятность принятия решения о том, что нулевую гипотезу следует отвергнуть, когда указанная нулевая гипотеза является в действительности справедливой, составляет не более, чем установленное значение вероятности. Указанный тип анализа обеспечивает возможность указанных применений, в которых вероятность принятия решения отвержения может быть намного меньше уровня значимости для некоторых наборов допущений, включенных в нулевую гипотезу.

Согласно конкретным типичным вариантам реализации изобретения статистически значимая дифференциальная экспрессия может включать ситуации, когда уровень экспрессии данной последовательности AARS обеспечивает по меньшей мере примерно 1,2×, 1,3×, 1,4×, 1,5×, 1,6×, 1,7×, 1,8×, 1,9×, 2,0×, 2,2×, 2,4×, 2,6×, 2,8×, 3,0×, 4,0×, 5,0×, 6,0×, 7,0×, 8,0×, 9,0×, 10,0×, 15,0×, 20,0×, 50,0×, 100,0×, или больше, отличие от экспрессии (т.е. обеспечивает дифференциальную экспрессию, которая может быть выше или ниже экспрессии) в предполагаемом биологическом образце по сравнению с соответствующим контролем, включая все целые числа и десятичные дроби между ними (например, 1,24×, 1,25×, 2,1×, 2,5×, 60,0×, 75,0× и т.д.). Согласно конкретным вариантам реализации изобретения статистически значимая дифференциальная экспрессия может включать ситуации, когда уровень экспрессии конкретной последовательности AARS обеспечивает по меньшей мере примерно на 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000%, или больше, различие в экспрессии (т.е. дифференциальную экспрессию, которая может быть выше или ниже) в предполагаемом биологическом образце по сравнению с соответствующим контролем, включая все

целые числа и десятичные дроби между ними.

В качестве дополнительного примера, дифференциальную экспрессию также можно определить путем проведения Z-тестирования, т.е. расчета абсолютного Z-показателя, как описано в настоящем изобретении и известно в данной области техники (см. пример 1). Z-тестирование, как правило, используется для идентификации достоверных различий между средним для образца и средним для популяции. Например, по сравнению со стандартной нормальной таблицей (например, контрольной тканью), при доверительном интервале 95% (т.е. при уровне значимости 5%), Z-показатель с абсолютным значением более 1,96 указывает на неслучайность. Для доверительного интервала 99%, если абсолютный Z-показатель больше 2,58, то это означает, что $p < 0,01$, и различие даже более достоверно нулевая гипотеза может быть отвергнута с большим доверием. Согласно указанным и связанным вариантам реализации изобретения абсолютный Z-показатель, равный 1,96, 2, 2,58, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более, включая все десятичные дроби между ними (например, 10,1, 10,6, 11,2 и т.д.), может обеспечивать высокое значение статистической значимости. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения абсолютный Z-показатель, равный более, чем 6, может обеспечить крайне высокую статистическую значимость.

"По существу аналогичный" в целом относится к отсутствию статистически значимого различия в уровне экспрессии между биологическим образцом и эталонным контролем. Примеры фактически одинакового уровня экспрессии могут включать ситуации, где уровень экспрессии данного SSCIGS обеспечивает меньше примерно 0,05×, 0,1×, 0,2×, 0,3×, 0,4×, 0,5×, 0,6×, 0,7×, 0,8×, 0,9×, 1,0×, 1,1×, 1,2×, 1,3× или 1,4× различие в экспрессии (т.е. дифференциальную экспрессию, которая может представлять собой более высокую или более низкую экспрессию) в предполагаемом биологическом образце по сравнению с эталонным образцом, включая все десятичные дроби между ними (например, 0,15×, 0,25×, 0,35× и т.д.). Согласно конкретным вариантам реализации изобретения дифференциальная экспрессия может включать ситуации, где уровень экспрессии данной последовательности AARS обеспечивает меньше примерно на 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50% различие в экспрессии (т.е. дифференциальную экспрессию, которая может представлять собой более высокую или более низкую экспрессию) в предполагаемом биологическом образце по сравнению с эталонным образцом, включая все десятичные дроби между ними.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, например, когда используют микрочип Affymetrix для измерения уровня экспрессии эталонной последовательности полинуклеотида или полипептида AARS, дифференциальная экспрессия может также быть определена с помощью среднего значения экспрессии, суммированного с помощью программы Affymetrix Microarray Suite 5 (Affymetrix, Санта Клара, Калифорния) или других подобных программ, как правило, при определенном среднем значении экспрессии, равном 1000.

Варианты реализации настоящего изобретения включают способы детектирования присутствия или уровня эталонной последовательности полинуклеотида или полипептида AARS или его части для различения клеток или тканей или других биологических образцов различных организмов или видов, где присутствие или уровень указанной последовательности связан с выбранным организмом или видом. Общие примеры включают способы различения между человеком и любой комбинацией бактерий, грибов, растений и других животных, отличных от человека. Для животных включены способы проведения различия между человеком и любой комбинацией позвоночных и беспозвоночных, включая позвоночных, таких как рыбы, амфибии, рептилии, птицы и млекопитающие, отличные от человека, и беспозвоночных, таких как насекомые, моллюски, ракообразные и кораллы. Для млекопитающих, отличных от человека, включены способы проведения различия между человеком и любой комбинацией млекопитающих, отличных от человека, из Afrosoricida, Macroscelidea, Tubulidentata, Hyracoidea, Proboscidea, Sirenia, Cingulata, Pilosa, Scandentia, Dermoptera, Primates, Rodentia, Lagomorpha, Erinaceomorpha, Soricomorpha, Chiroptera, Pholidota, Cetacea, Carnivora, Perissodactyla или Artiodactyla. В подкласс Приматов (Primate) включены мартишки, обезьяны, гориллы и шимпанзе, среди прочих, известных в данной области техники. Соответственно, присутствие или уровень эталонной последовательности полинуклеотида или полипептида AARS или варианта, описанного в настоящем изобретении, может использоваться для идентификации источника конкретного биологического образца, такого как клетка, ткань или орган, путем проведения различия между любой комбинацией указанных организмов или путем проведения различия между человеком и любым одним или более из указанных организмов, например, группой организмов. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения источник конкретного биологического образца может также быть определен путем сравнения присутствия или уровня последовательности AARS или ее части с заранее определенным значением.

Варианты реализации настоящего изобретения включают способы выявления присутствия или уровня эталонной последовательности полинуклеотида или полипептида AARS или его части для проведения различия между клетками или другими биологическими образцами, которые происходят из различных тканей или органов. Неограничивающие примеры включают способы проведения различия между клеткой или другим биологическим образцом, который происходит из любой комбинации из кожи

(например, дермы, эпидермиса, подкожного слоя), волосяных фолликулов, нервной системы (например, мозга, спинного мозга, периферических нервов), слуховой системы или органов равновесия (например, внутреннего уха, среднего уха, наружного уха), респираторной системы (например, носа, трахеи, легких), гастроэзофагальных тканей, желудочно-кишечной системы (например, рта, пищевода, желудка, тонкой кишки, толстой кишки, прямой кишки), сосудистой системы (например, сердца, кровеносных сосудов и артерий), печени, мочевого пузыря, лимфатической/иммунной системы (например, лимфатических узлов, лимфоидных фолликулов, селезенки, тимуса, костного мозга), мочеполовой системы (например, почек, мочеточника, мочевого пузыря, уретры, шейки матки, фаллопиевых труб, яичников, матки, вульвы, предстательной железы, бульбоуретральных желез, придатка семенника, предстательной железы, семенных пузырьков, яичек), скелетно-мышечной системы (например, скелетных мышц, гладких мышц, костей, хряща, связок, сухожилий), жировой ткани, ткани молочной железы и эндокринной системы (например, гипоталамуса, гипофиза, щитовидной железы, поджелудочной железы, надпочечников). Таким образом, на основе связи с последовательностью полинуклеотида или полипептида AARS, описанной в настоящем изобретении, указанные способы можно применять для идентификации или исследования ткани или органа, из которого была получена клетка или другой биологический образец.

Варианты реализации настоящего изобретения включают способы выявления присутствия или уровня эталонной последовательности полинуклеотида или полипептида AARS, или его части, для исследования или проведения различия между стадиями развития или дифференцировки клетки. Также включены способы проведения различия между зародышевыми клетками, стволовыми клетками и соматическими клетками. Примеры стадий развития включают стадию новорожденного и взрослого организма. Примеры стадий дифференцировки клеток включают все из отдельных и идентифицируемых состояний между тотипотентной клеткой, плюрипотентной клеткой, мультипотентной прогениторной стволовой клеткой и зрелой, полностью дифференцированной клеткой.

Тотипотентная клетка, имеющая общий потенциал, как правило возникает в результате полового и неполового размножения и включает споры и зиготы, хотя в конкретных примерах указанные клетки могут дедифференцироваться и восстанавливать тотипотентность. Плюрипотентная клетка включает стволовую клетку, которая имеет способность дифференцироваться в любой из трех зародышевых листков, включая энтодерму (внутренняя выстилка желудка, желудочно-кишечный тракт, легкие), мезодерму (мышцы, кость, кровь, мочеполовая система) и эктодерму (эпидермальные ткани и нервная система).

Мультипотентные клетки-предшественники, как правило, способны дифференцироваться в ограниченное число типов тканей. Примеры мультипотентных клеток включают, но не ограничиваются перечисленными: гематопоетические стволовые клетки (взрослые стволовые клетки) из костного мозга, которые дают начало клеткам иммунной системы, таким как эритроциты, лейкоциты крови и тромбоциты, мезенхимальные стволовые клетки (взрослые стволовые клетки) из костного мозга, которые дают начало стромальным клеткам, жировым клеткам и различным типам клеток кости, эпителиальные стволовые клетки (клетки-предшественники), которые дают начало различным типам клеток кожи, и мышечные сателлитные клетки (клетки-предшественники), которые вносят вклад в дифференцированную мышечную ткань. Соответственно, присутствие или уровень конкретной последовательности полинуклеотида или полипептида AARS (например, границы сплайсинга сплайс-варианта AARS, протеолитического фрагмента AARS), может использоваться для исследования или проведения различия между вышеуказанными стадиями дифференцировки клеток и контролем или предварительно определенным уровнем.

Варианты реализации настоящего изобретения включают способы выявления присутствия или уровня эталонной последовательности полинуклеотида или полипептида AARS для исследования или диагностирования состояния или клетки, ткани, органа или субъекта, в котором указанное состояние может быть охарактеризовано как здоровое, не здоровое, подверженное риску заболевания или подверженное лечению. Для указанных диагностических целей, термин "диагностический" или "диагностировать" включает идентификацию присутствия или природы патологического состояния, определение риска развития указанного состояния и/или измерение изменения (или отсутствия изменения) патологического состояния в ответ на лечение. Диагностические способы могут отличаться по чувствительности и специфичности. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения "чувствительность" диагностического анализа относится к проценту больных клеток, тканей или субъектов, которые имеют положительный ответ в указанном анализе (процент "истинно положительных"). Больные клетки, ткани или субъекты, не выявляемые с помощью анализа, как правило, называются "ложно отрицательными". Клетки, ткани или субъекты, которые не являются больными и которые имеют отрицательный ответ в анализе, могут называться "истинно отрицательными". Согласно конкретным вариантам реализации изобретения "специфичность" диагностического анализа может быть определена как один (1) минус частота встречаемости "ложно позитивных", где частота встречаемости "ложно позитивных" определяется как отношение образцов или субъектов, не являющихся больными, которые имеют положительный ответ в анализе. Поскольку конкретные диагностические способы могут не обеспечивать точного диагностирования состояния, является достаточным, если способ обеспечивает положительную индикацию, способствующую диагностированию.

В конкретных примерах, существование риска развития патологического состояния можно диагно-

стировать путем сравнения присутствия или уровня одной или более выбранной эталонной последовательности полинуклеотида или полипептида AARS, или его частей, который коррелирует с состоянием на основе повышенного или пониженного уровня по сравнению с подходящим контролем. "Подходящий контроль" или "соответствующий контроль" включает значение, уровень, признак, характеристику или свойство, определенное в клетке или другом биологическом образце ткани или организма, например, контрольная или нормальная клетка, ткань или организм, проявляющий, например, нормальные признаки, таких как отсутствие состояния. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения "подходящий контроль" или "соответствующий контроль" представляет собой предварительно определенное значение, уровень, признак, характеристику или свойство. Другие подходящие контроли очевидны специалистам в данной области техники. Примеры заболеваний и состояний описаны в другой части настоящего изобретения.

Варианты реализации настоящего изобретения включают способы детектирования на основе полинуклеотида или нуклеиновой кислоты AARS, которые обеспечивают конкретные преимущества благодаря чувствительности детектирования. Таким образом, конкретные варианты реализации изобретения относятся к применению или детектированию полинуклеотидов AARS как части способа диагностики или диагностической тест-системы. Присутствие и/или уровень полинуклеотидов AARS можно измерять с помощью любого способа, известного в данной области техники, включая гибридационные анализы, такие как Нозерн-блоттинг, количественная или качественная полимеразная цепная реакция (ПЦР), количественная или качественная ПЦР с обратной транскриптазой (RT-ПЦР), микрочип, дот- или спот-блоттинг или *in situ* гибридизация, такая как флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), среди других способов. Конкретные из указанных способов описаны более подробно ниже.

Полинуклеотиды AARS, такие как ДНК и РНК, могут быть собраны и/или получены из крови, биологических жидкостей, тканей, органов, клеточных линий или других подходящих образцов с использованием методов, известных в данной области техники, таких как методы, описанные в источнике (Kingston, 2002 *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (см., например, как описано в источнике Nelson et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 11890-11895, 2002)) и в других источниках. Более того, различные коммерчески доступные наборы для конструирования РНК применимы для создания РНК для использования согласно настоящему изобретению. РНК может быть создана из органов/тканей/клеток, полученных из нормальных здоровых субъектов; однако, настоящее изобретение также рассматривает конструирование РНК из не здоровых субъектов. Конкретные варианты реализации изобретения предполагают использование любого типа органа из любого типа субъекта или животного. Для тестируемых образцов РНК может быть получена из индивида (например, животного, включая млекопитающих), страдающего или не страдающего видимым заболеванием, и из образцов ткани, биологических жидкостей (например, цельной крови) или т.п.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения амплификация или конструирование последовательности кДНК может быть полезным для повышения детектирующей способности. Согласно настоящему изобретению, также как и в данной области техники, предложен необходимый уровень детализации для осуществления указанных задач. Согласно одному типичному варианту реализации изобретения цельная кровь используется в качестве источника РНК и, соответственно, необязательно используются РНК-стабилизирующие реагенты, такие как PAX-пробирки, как описано, например, в источниках Thach et al., *J. Immunol. Methods*. Dec 283 (1-2):269-279, 2003 и Chai et al., *J. Clin. Lab Anal.* 19 (5):182-188, 2005 (оба из которых включены посредством ссылки). Библиотеки комплементарной ДНК (кДНК) могут быть созданы с использованием методов, известных в данной области техники, таких как методы, описанные в источниках Ausubel et al. (2001 *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Sambrook et al. (1989 *Molecular Cloning*, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatis et al. (1982 *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY), а также в других источниках. Кроме того, различные коммерчески доступные наборы для создания библиотеки кДНК являются применимыми для создания библиотеки кДНК согласно настоящему изобретению. Могут быть созданы библиотеки из органов/тканей/клеток, полученных от нормальных здоровых субъектов.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения можно применять способы гибридизации для детектирования полинуклеотидных последовательностей AARS. Способы проведения анализов гибридизации полинуклеотидов хорошо развиты в данной области техники. Методы и условия гибридационного анализа варьируют в зависимости от применения и выбраны в соответствии с общими известными методами связывания, включая методы, на которые ссылаются в источниках Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Ed. Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); Berger and Kimmel *Methods in Enzymology*, Vol. 152, *Guide to Molecular Cloning Techniques* (Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1987); Young and Davis, *PNAS*. 80: 1194 (1983). Способы и приборы для осуществления воспроизводимых и контролируемых реакций гибридизации были описаны в патентах США № 5871928, 5874219, 6045996 и 6386749, 6391623, каждый из которых включен в настоящее изобретение посредством ссылки.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения можно применять способы амплификации нуклеиновых кислот для детектирования полинуклеотидных последовательностей AARS. Термин

"амплификация" или "амплификация нуклеиновых кислот" относится к продукции множества копий нуклеиновой кислоты-мишени, которая содержит по меньшей мере часть предполагаемой специфической последовательности-мишени нуклеиновой кислоты. Множество копий может называться ампликоном или продуктами амплификации. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения амплифицированная мишень содержит не полную последовательность гена-мишени (интроны и экзоны) или экспрессированную последовательности гена-мишени (сплайсированный транскрипт экзонов и фланкирующих нетранслируемых последовательностей). Например, специфические ампликоны могут продуцироваться путем амплификации части интересующего полинуклеотида при использовании праймеров для амплификации, которые гибридизуются и иницируют полимеризацию со внутренних сайтов интересующего полинуклеотида.

Предпочтительно, амплифицируемая часть содержит поддающуюся выявлению последовательность-мишень, которая может быть выявлена с использованием любого из различных хорошо известных способов.

"Селективная амплификация" или "специфичная амплификация", в настоящем изобретении, относится к амплификации последовательности-мишени нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, где выявляемая амплификация последовательности-мишени по существу ограничена амплификацией последовательности-мишени, в которую вносит вклад интересующий образец нуклеиновой кислоты, подверженный тестированию, и не вносит вклад последовательность нуклеиновой кислоты-мишени, полученная из другого источника образца, например, загрязнения, присутствующего в реагентах, используемых во время реакций амплификации, или в окружении, в котором проводят указанные реакции амплификации.

Термин "условия амплификации" относится к условиям, обеспечивающим амплификацию нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением. Условия амплификации, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, могут быть менее жесткими по сравнению с "жесткими условиями гибридизации", описанными в настоящем изобретении. Олигонуклеотиды, используемые в реакциях амплификации согласно настоящему изобретению гибридизуются с их предполагаемыми мишенями в условиях амплификации, но могут или не могут гибридизоваться при жестких условиях гибридизации. С другой стороны, зонды для детектирования согласно настоящему изобретению, как правило, гибридизуются при жестких условиях гибридизации. Приемлемые условия для осуществления амплификации нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением могут быть с легкостью определены специалистом в данной области техники в зависимости от конкретного используемого способа амплификации.

Многие хорошо известные способы амплификации нуклеиновых кислот требуют термоциклирования для чередования циклов денатурации двуцепочечной нуклеиновой кислоты и гибридизации праймеров; однако, другие хорошо известные способы амплификации нуклеиновых кислот являются изотермическими. Полимеразная цепная реакция (патенты США № 4683195; 4683202; 4800159; 4965188), обычно называемая ПЦР, использует множество циклов денатурации, отжига пар праймеров с комплементарной цепочкой и удлинения праймеров с экспоненциальным увеличением числа копий последовательности-мишени. В вариации, называемой RT-ПЦР, обратная транскриптаза (RT) используется для создания комплементарной ДНК (кДНК) на основе мРНК, и указанная кДНК затем амплифицируется с помощью ПЦР для продукции множества копий ДНК.

Как отмечено выше, термин "ПЦР" относится к множеству циклов амплификации, которые селективно амплифицируют намеченный вид нуклеиновой кислоты. Включены количественная ПЦР (кПЦР), ПЦР в реальном времени, ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и количественная ПЦР с обратной транскрипцией (аРВ-ПЦР), хорошо описанные в данной области техники. Термин "рПЦР" относится к количественной полимеразной цепной реакции и термин "кОТ-ПЦР" относится к количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. кПЦР и кОТ-ПЦР можно применять для амплификации и одновременной количественной оценки молекулы кДНК-мишени. Она обеспечивает и детектирование, и количественную оценку специфической последовательности в пуле кДНК, такой как выбранный ген или транскрипт.

"ПЦР в реальном времени" может использовать ДНК-связывающий краситель для связывания со всеми двуцепочечными (дц) ДНК в ПЦР, приводя к флуоресценции красителя. Увеличение количества продукта ДНК во время ПЦР, следовательно, приводит к повышению интенсивности флуоресценции и измеряется в каждом цикле, таким образом, позволяя количественно оценивать концентрацию ДНК. Однако красители дцДНК, такие как SYBR Green, связываются со всеми ПЦР-продуктами дцДНК. Флуоресценцию выявляют и измеряют в термоциклере для ПЦР в реальном времени и ее возрастание в геометрической прогрессии, соответствующее экспоненциальному росту количества продукта, используется для определения порогового цикла ("Ct") в каждой реакции.

Термин "значение Ct" относится к значению порогового цикла, который представляет собой цикл, при котором ПЦР-амплификация превосходит пороговый уровень. Если присутствует более высокое количество мРНК для конкретного гена в образце, то она превысит порог раньше по сравнению с геном, экспрессируемым на низком уровне, из-за большего количества исходной РНК для амплификации. Таким образом, низкое значение Ct указывает на высокий уровень экспрессии гена в образце, и высокое

значение *St* указывает на низкий уровень экспрессии гена.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения может использоваться лигазная цепная реакция (Weiss, Science. 254: 1292, 1991), обычно называемая ЛЦР, которая использует два набора комплементарных олигонуклеотидов ДНК, которые гибридизуются с соседними участками нуклеиновой кислоты-мишени. Олигонуклеотиды ДНК ковалентно связываются с помощью ДНК-лигазы в повторяющихся циклах термической денатурации, гибридизации и лигирования для получения поддающегося выявлению двуцепочечного лигированного олигонуклеотидного продукта.

Другой способ представляет собой амплификацию с перемещением цепи (Walker, G. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:392-396; патенты США № 5270184 и 5455166), обычно называемую SDA, которая использует циклы отжига последовательностей пар праймеров с комплементарными цепочками последовательности-мишени, удлинения праймера в присутствии dNTP α S для продукции дуплекса гемифосфоротиотированного продукта удлинения праймера, опосредованное эндонуклеазами внесение одноцепочечного разрыва в гемимодифицированный сайт распознавания рестрикционной эндонуклеазы и опосредованное полимеразой удлинение праймера от 3'-конца одноцепочечного разрыва с перемещением существующей цепочки и созданием цепочки для следующего цикла отжига праймеров, внесения одноцепочечного разрыва и перемещения цепочки, которая приводит к амплификации продукта в геометрической прогрессии. Термофильная SDA (tSDA) использует термофильные эндонуклеазы и полимеразы при более высоких температурах по существу таким же способом (европейский патент № 0684315).

Другие способы амплификации включают, например: амплификацию на основе последовательности нуклеиновой кислоты (патент США № 5130238), обычно называемую NASBA; амплификацию, которая использует РНК-репликазу для амплификации самой молекулы зонда (Lizardi, P. et al., 1988, Bio-Technol. 6: 1197-1202), обычно называемую Q β -репликаза; способ амплификации на основе транскрипции (Kwoh, D. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177); самоподдерживающуюся репликацию последовательности (Guatelli, J. et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878); и опосредованную транскрипцией амплификацию (патент США № 5480784 и 5399491), обычно называемую TMA. Более подробное обсуждение известных способов амплификации можно найти в источнике Persing, David H., 1993, "In Vitro Nucleic Acid Amplification Techniques" in Diagnostic Medical Microbiology: Principles and Applications (Persing et al., Eds.), p. 51-87 (American Society for Microbiology, Washington, DC)).

Иллюстративные системы амплификации на основе транскрипции согласно настоящему изобретению включают TMA, которая использует РНК-полимеразу для продукции множества РНК-транскриптов участка-мишени (патент США № 5480784 и 5399491). TMA использует "промотор-праймер", который гибридизуется с нуклеиновой кислотой-мишенью в присутствии обратной транскриптазы и РНК-полимеразы для образования двуцепочечного промотора, из которого РНК-полимераза продуцирует РНК-транскрипты. Указанные транскрипты могут становиться матрицей для дальнейших циклов TMA в присутствии второго праймера, способного гибридизоваться с РНК-транскриптами. В отличие от ПЦР, ЛЦР или других способов, которые требуют термической денатурации, TMA представляет собой изотермический способ, использующий активность РНКазы H для расщепления цепочки РНК гибрида РНК:ДНК, таким образом, создавая цепочку ДНК, доступную для гибридизации с праймером или промотором-праймером. В целом используется активность РНКазы H вместе с обратной транскриптазой, обеспечивающей амплификацию.

В иллюстративном способе TMA, один праймер для амплификации представляет собой олигонуклеотидный промотор-праймер, который содержит последовательность промотора, которая становится функциональной, когда является двуцепочечной, расположенную со стороны 5' по отношению к связывающейся с мишенью последовательности, которая способна гибридизоваться с сайтом связывания РНК-мишени в положении 3' по отношению к последовательности, которую предполагается амплифицировать.

Промотор-праймер может называться "Т7-праймер", когда он является специфичным для распознавания РНК-полимеразы Т7. При конкретных обстоятельствах 3'-конец промотора-праймера или субпопуляции указанных промоторов-праймеров, может быть модифицирован для блокировки или уменьшения удлинения праймера. Из немодифицированного промотора-праймера обратная транскриптаза создает копию кДНК РНК-мишени, тогда как активность РНКазы H деградирует РНК-мишень. Второй праймер для амплификации затем связывается с кДНК. Указанный праймер может называться "не-Т7 праймер" для отличия его от "Т7-праймера". Из указанного второго праймера для амплификации обратная транскриптаза создает другую цепочку ДНК, что приводит к образованию двуцепочечной ДНК, содержащей функциональный промотор на одном конце. Когда последовательность промотора является двуцепочечной, она способна связываться с РНК-полимеразой для начала транскрипции последовательности-мишени, с которой был гибридизован промотор-праймер. РНК-полимераза использует указанную последовательность промотора для продукции множества РНК-транскриптов (т.е. ампликонов) в целом примерно от 100 до 1000 копий. Каждый новый синтезированный ампликон может гибридизоваться со вторым праймером для амплификации. Обратная транскриптаза затем может создавать копию ДНК, тогда как активность РНК-азы H приводит к деградации РНК указанного дуплекса РНК:ДНК. Промотор-

праймер затем может связываться с новой синтезированной ДНК, позволяя обратной транскриптазе создавать двуцепочечную ДНК, из которой РНК-полимераза продуцирует множество ампликонов. Таким образом, изотермическая амплификация в миллиард раз может достигаться с использованием двух праймеров для амплификации.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения другие методы можно применять для оценки РНК-транскриптов из транскриптов из конкретной библиотеки кДНК, включая анализ с использованием микрочипа (Han, M., et al., *Nat Biotechnol.* 19: 631-635, 2001; Bao, P., et al., *Anal Chem.* 74: 1792-1797, 2002; Schena et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10614-19, 1996; и Heller et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2150-55, 1997) и SAGE (серийный анализ экспрессии генов). Подобно MPSS, метод SAGE является цифровым и может производить большое количество специфических последовательностей (см., например, Velculescu, V. E., et al., *Trends Genet.* 16: 423-425., 2000; Tuteja R. and Tuteja N. *Bioessays.* 2004 Aug; 26(8):916-22), несмотря на то, что порядки величин для указанного анализа ниже по сравнению с методами, такими как MPSS.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения термин "микрочип" включает "микрочип нуклеиновых кислот", содержащий множество связанных с субстратом нуклеиновых кислот, где гибридизация с каждой из множества связанных нуклеиновых кислот отдельно поддается выявлению. Субстрат может быть твердым или пористым, плоским или неплоским, цельным или дискретным. Микрочипы нуклеиновых кислот включают все устройства, указанные в источниках Schena (ed.), *DNA Microarrays: A Practical Approach* (Practical Approach Series), Oxford University Press (1999); *Nature Genet.* 21(1) (suppl.): 1-60 (1999); Schena (ed.), *Microarray Biochip: Tools and Technology*, Eaton Publishing Company/BioTechniques Books Division (2000). Микрочипы нуклеиновых кислот могут включать множество связанных с субстратом нуклеиновых кислот, в которых множество нуклеиновых кислот расположены на множестве гранул вместо цельного плоского субстрата, как описано, например, в источнике Brenner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(4): 1665-1670 (2000). Примеры микрочипов нуклеиновых кислот могут быть найдены в патентах США № 6391623, 6383754, 6383749, 6380377, 6379897, 6376191, 6372431, 6351712, 6344316, 6316193, 6312906, 6309828, 6309824, 6306643, 6300063, 6287850, 6284497, 6284465, 6280954, 6262216, 6251601, 6245518, 6263287, 6251601, 6238866, 6228575, 6214587, 6203989, 6171797, 6103474, 6083726, 6054274, 6040138, 6083726, 6004755, 6001309, 5958342, 5952180, 5936731, 5843655, 5814454, 5837196, 5436327, 5412087 и 5405783, описания которых включены посредством ссылки.

Дополнительные примеры включают чипы нуклеиновых кислот, которые являются коммерчески доступными из компании Affymetrix (Санта-Клара, Калифорния) под брендовым названием GE-NECHIP™. Другие типичные способы изготовления и применения чипов предложены, например, в патентах США № 7028629; 7011949; 7011945; 6936419; 6927032; 6924103; 6921642 и 6818394.

Настоящее изобретение, в отношении чипов и микрочипов, также предполагает различные способы применения полимеров, присоединенных к твердым субстратам. Способы применения включают мониторинг экспрессии генов, анализ уровня экспрессии, скрининг библиотек, генотипирование и диагностику. Способы мониторинга и анализа уровня экспрессии генов и способы, применимые для мониторинга и анализа уровня экспрессии генов описаны в патентах США № 5800992, 6013449, 6020135, 6033860, 6040138, 6177248 и 6309822. Генотипирование и способы его применения описаны в патентах США № 10/442021, 10/013598 (публикация заявки на патент США № 2003/0036069) и патентах США № 5925525, 6268141, 5856092, 6267152, 6300063, 6525185, 6632611, 5858659, 6284460, 6361947, 6368799, 6673579 и 6333179. Другие способы амплификации нуклеиновых кислот, мечения и анализа, которые можно применять в комбинации со способами, раскрытыми в настоящем изобретении, описаны в патентах США № 5871928, 5902723, 6045996, 5541061 и 6197506.

Как очевидно специалистам в данной области техники, согласно конкретным вариантам реализации изобретения можно применять олигонуклеотиды, такие как праймеры или зонды, для амплификации или детектирования, как описано в настоящем изобретении. Олигонуклеотиды определенной последовательности и химической структуры могут быть получены с помощью методов, известных специалистам в данной области техники, таких как химический или биохимический синтез и *in vitro* или *in vivo* экспрессия из молекул рекомбинантных нуклеиновых кислот, например, бактериальных или вирусных векторов. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения олигонуклеотид не состоит только из хромосомной ДНК дикого типа или продуктов ее *in vivo* транскрипции.

Олигонуклеотиды или праймеры могут быть модифицированы любым образом, при условии, что данная модификация является совместимой с желаемой функцией конкретного олигонуклеотида. Специалист в данной области техники может с легкостью определить, является ли данная модификация подходящей или желаемой для любого конкретного олигонуклеотида согласно настоящему изобретению. Подходящие олигонуклеотиды AARS описаны более подробно в другой части настоящего изобретения.

В то время как структура и последовательность олигонуклеотидов зависит от их функции, описанной в настоящем изобретении, в целом учитываются некоторые параметры. Примерами наиболее подходящих параметров является длина, температура плавления (T_m), специфичность, комплементарность другим олигонуклеотидам в системе, содержание G/C, полипиримидиновые (T, C) или полипуриновые (A, G) участки и 3'-концевая последовательность. Контроль указанных и других параметров представляет

собой стандартный и хорошо известный аспект конструкции олигонуклеотидов, и различные компьютерные программы с легкостью доступны для скрининга большого количества потенциальных олигонуклеотидов для поиска оптимальных вариантов.

Конкретные варианты реализации изобретения таким образом включают способы детектирования интересующего полинуклеотида AARS в образце, полинуклеотида, содержащего последовательность эталонного полинуклеотида AARS, описанного в настоящем изобретении, включающие а) гибридизацию образца с зондом, содержащим последовательность, комплементарную полинуклеотиду-мишени в образце, где указанный зонд специфично гибридизуется с указанным полинуклеотидом-мишенью, в условиях, при которых образуется комплекс гибридизации между указанным зондом и указанным полинуклеотидом-мишенью, или его фрагментом и б) детектирование присутствия или отсутствия указанного комплекса гибридизации и, необязательно, при его наличии, определение его количества. Также включены способы детектирования интересующего полинуклеотида AARS в образце, полинуклеотида, содержащего последовательность эталонного полинуклеотида AARS, описанного в настоящем изобретении, включающие а) амплификацию полинуклеотида-мишени или его фрагмента и б) детектирование присутствия или отсутствия указанного амплифицированного полинуклеотида-мишени, или его фрагмента, и, необязательно, при его наличии, определения его количества. Конкретные варианты реализации изобретения относятся к выявлению сплайс-вариантов AARS, например, к выявлению уникальной границы сплайсинга сплайс-варианта, путем гибридизации, амплификации или других способов детектирования.

Варианты реализации настоящего изобретения включают различные методы детектирования на основе полипептидов AARS, включая методы детектирования на основе антител. Согласно указанным вариантам реализации изобретения включено применение полипептидов AARS для создания антитела или других связывающих веществ, которые затем можно использовать в диагностических способах и композициях для детектирования или количественной оценки выбранных полипептидов AARS в клетке или другом биологическом образце, как правило, полученном от субъекта.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения можно применять стандартные методики и детекторы, такие как вестерн-блоттинг и иммунопреципитация, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), проточная цитометрия и иммуофлуоресцентные анализы (IFA), в которых используется устройство визуализации. Указанные хорошо известные способы, как правило, используют одно или более моноклональных или поликлональных антител, как описано в настоящем изобретении, которые специфично связываются с выбранным полипептидом AARS согласно изобретению или уникальным участком указанного полипептида AARS и в целом значительно не связываются с другими полипептидами AARS, такими как полноразмерный полипептид AARS. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения уникальный участок полипептида AARS может представлять собой уникальную трехмерную структуру, которую содержит новый идентифицированный белковый фрагмент AARS.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения можно применять "чипы", такие как "микрочипы". Согласно конкретным вариантам реализации изобретения "микрочип" также может относиться к "пептидному микрочипу" или "белковому микрочипу", имеющему набор или множество связанных с субстратом полипептидов, где связывание с каждым из множества связанных полипептидов отдельно поддается выявлению. В альтернативном варианте пептидный микрочип может содержать множество связывающих веществ, включая, но не ограничиваясь перечисленными: моноклональные антитела, поликлональные антитела, связывающие вещества из фагового дисплея, связывающие вещества из дрожжевых двугидридных систем и аптамеры, которые могут специфично выявлять связывание полипептидов AARS, описанных в настоящем изобретении. Чип может быть основан на выявлении с помощью аутоантител указанных полипептидов AARS, как описано, например, в источнике Robinson et al., Nature Medicine 8(3):295-301 (2002). Примеры пептидных чипов могут быть найдены в публикациях международных заявок на патент WO 02/31463, WO 02/25288, WO 01/94946, WO 01/88162, WO 01/68671, WO 01/57259, WO 00/61806, WO 00/54046, WO 00/47774, WO 99/40434, WO 99/39210 и WO 97/42507 и патентах США № 6268210, 5766960 и 5143854, каждый из которых включен посредством ссылки.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения можно применять масс-спектрометрические или другие способы, основанные на определении молекулярной массы, для диагностического детектирования последовательностей полипептида AARS. Масс-спектрометрия (МС) в целом относится к аналитическому методу определения элементарного состава образца или молекулы. МС также может использоваться для определения химических структур молекул, таких как пептиды и другие химические соединения.

В целом масс-спектрометрия (МС) основана на ионизации химических соединений с образованием заряженных молекул или фрагментов молекул и последующем измерении отношения их массы к заряду. Согласно иллюстративному МС-методу, образец наносили на прибор МС и испаряли, компоненты образца ионизировали с помощью одного из различных способов (например, путем воздействия на них электронным лучом), которые приводят к формированию положительно заряженных частиц, положительные ионы затем ускоряются магнитным полем. Расчет отношения массы частиц к заряду (m/z) проводили на основе деталей перемещения ионов по мере их прохождения через электромагнитные поля, и детектирования ионов, которые были отсортированы на предыдущем этапе в соответствии с m/z .

Иллюстративные МС-приборы имеют три модуля: ионный источник, который превращает газовую фазу образца молекулы в ионы (или, в случае ионизации электрораспылением, перемещает ионы, которые существуют в растворе, в газовую фазу); массовый анализатор, который сортирует ионы по их массе путем приложения электромагнитных полей; и детектор, который измеряет значение количества индикатора и, таким образом, обеспечивает данные для расчета относительно содержания избытка каждого присутствующего иона.

Метод МС имеет как качественное, так и количественное применения, включая идентификацию неизвестных соединений, определение изотопного состава элементов в молекуле и определение структуры соединения путем наблюдения его фрагментации. Другие применения включают количественную оценку соединения в образце или исследование основ химии ионов газовой фазы (химии ионов и нейтронов в вакууме). Включены газовая хроматография-масс-спектрометрия (GC/MS или GC-MS), жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (LC/MS или ЖХ/МС) и спектрометрия ионной подвижности/масс-спектрометрия (IMS/MS или IMMS). Соответственно, МС-методы можно применять в соответствии с любым из способов, предложенных в настоящем изобретении, для измерения присутствия или уровня полипептида AARS согласно изобретению в биологическом образце и для сравнения указанных уровней с контрольным образцом или заранее определенным значением.

Согласно конкретным вариантам реализации

изобретения можно применять устройства/способы сортировки клеток или визуализации клеток или отображения для детектирования или количественной оценки присутствия или уровня полинуклеотидов или полипептидов AARS. Примеры включают проточную цитометрию с активированной флуоресценцией или FACS, иммунофлуоресцентный анализ (IFA) и метод *in situ* гибридизации, такой как флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH).

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения можно применять стандартные биологические способы, программы и системы для диагностических целей. Продукты компьютерного программного обеспечения согласно изобретению, как правило, включают машиночитаемый носитель, содержащий выполняемые компьютером программы для проведения логических этапов способа согласно изобретению. Подходящие машиночитаемые носители включают гибкий диск, CD-ROM/DVD/DVD-ROM, жесткий диск, флэш-память, ROM/RAM, магнитные ленты и т.д. Выполняемые компьютером программы могут быть написаны на подходящем компьютерном языке или комбинации нескольких языков. Основные методы вычислительной биологии описаны, например, в источниках Setubal and Meidanis et al., *Introduction to Computational Biology Methods* (PWS Publishing Company, Boston, 1997); Salzberg, Searles, Kasif, (Ed.), *Computational Methods in Molecular Biology*, (Elsevier, Amsterdam, 1998); Rashidi and Buehler, *Bioinformatics Basics: Application in Biological Science and Medicine* (CRC Press, London, 2000) и Ouelette and Bzevanis *Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins* (Wiley & Sons, Inc., 2nd ed., 2001). См. патент США № 6420108.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения можно применять различные компьютерные программные продукты и обеспечения для различных целей, таких как создание зонда, управление данными, анализ и работа прибора. См. патенты США № 5593839, 5795716, 5733729, 5974164, 6066454, 6090555, 6185561, 6188783, 6223127, 6229911 и 6308170.

Дискретный анализ полного генома (WGSA) описан, например, в источниках Kennedy et al., *Nat. Biotech.* 21, 1233-1237 (2003), Matsuzaki et al., *Gen. Res.* 14: 414-425, (2004), и Matsuzaki, et al., *Nature Methods* 1:109-111 (2004). Алгоритмы для использования в методах картирования описаны, например, в источниках Liu et al., *Bioinformatics.* 19: 2397-2403 (2003) и Di et al., *Bioinformatics.* 21:1958 (2005). Дополнительные способы, связанные с WGSA, и чипы, применимые для WGSA, и области применения WGSA описаны, например, в заявке на патент США № 60/676058, поданной 29 апреля 2005 г., 60/616273, поданной 5 октября 2004 г., 10/912445, 11/044831, 10/442021, 10/650332 и 10/463991. Полногеномные исследования связей генотипа с различными фенотипическими признаками (Genome wide association studies) с использованием методов картирования описаны, например, в источниках Hu et al., *Cancer Res.* 65(7):2542-6 (2005), Mitra et al., *Cancer Res.* 64(21):8116-25 (2004), Butcher et al., *Hum Mol Genet.* 14 (10):1315-25 (2005), и Klein et al., *Science.* 308 (5720):385-9 (2005).

Кроме того, конкретные варианты реализации изобретения могут включать способы предоставления генетической информации в сети, такой как интернет, как описано, например, в заявках на патент США № 10/197621, 10/063559 (публикация заявки на патент США № 2002/0183936), 10/065856, 10/065868, 10/328818, 10/328872, 10/423403 и 60/482389.

Х. Антисмысловые и РНК-агенты.

Варианты реализации настоящего изобретения также включают антисмысловые олигонуклеотиды и РНК-агенты, которые направлены на полинуклеотидные последовательности AARS, и способы их применения для снижения экспрессии выбранного транскрипта и/или белкового фрагмента AARS. Конкретные варианты реализации изобретения относятся к одной или более границам сплайсинга (часто уникальным), которые генерируют сплайс-вариант белкового фрагмента AARS согласно настоящему изобретению. Также включены способы ингибирования на основе антисмысловых или РНК агентов, которые направлены на конкретные сплайс-формы, для стимуляции или подавления сплайсинга выбранного

белкового фрагмента. Согласно конкретным предпочтительным вариантам реализации изобретения границы сплайсинга, которые генерируют белковые фрагменты AARS, экспрессируются на повышенном уровне в конкретных тканях и являются уникальными для указанного сплайс-варианта. Согласно указанным и связанным вариантам реализации изобретения указанные сплайс-варианты не только являются источником цитозольной активности AARS в интересующем типе клеток. Например, конкретные сплайс-варианты, которые являются предполагаемой мишенью, могут составлять примерно 10%-50% общего числа копий сплайс-вариантов РНК AARS в конкретной клетке или ткани, и предпочтительно примерно 1-10% общего числа копий сплайс-вариантов РНК AARS в конкретной клетке или ткани. Сплайс-варианты, которые составляют примерно <1% общего числа копий сплайс-вариантов РНК AARS в конкретной клетке или ткани, также могут являться мишенью.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения антисмысловые или РНК-агенты не направлены на полноразмерный белок, так как полноразмерные белки отвечают за ключевые этапы синтеза белка, что, таким образом, позволяет избежать летальности, которая часто является результатом нокаута AARS дикого типа. Конкретные способы, описанные в настоящем изобретении, таким образом, можно применять для избежания нежелательных эффектов, таких как токсичность, как при лечении хронических, так и острых заболеваний, и для селективной модуляции неканонических видов активности белкового фрагмента AARS. Однако конкретные варианты реализации изобретения могут в общем быть направлены на последовательности AARS, включая полноразмерные последовательности AARS, например, на уничтожение или существенное нарушение физиологии клетки- или ткани-мишени.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения сплайс-вариант AARS, являющийся предполагаемой мишенью, обладает неканонической биологической активностью. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения сплайс-вариант AARS имеет пониженную или не поддающуюся выявлению традиционную активность AARS, и связанный с использованием антисмысловых или РНК-агентов способ, в частности, модулирует его неканоническую активность. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения антисмысловые или РНК-агенты могут комбинироваться с подходом направленной или местной доставки для снижения системных нежелательных эффектов в отношении клеток и тканей, не являющихся мишенью. Среди прочего, как описано в настоящем изобретении, типичные клетки или ткани, на которые может быть таким образом направлено действие, включают раковые клетки и клетки или ткани, на которые может быть локально направлено действие путем местного применения, таких как опухоли или эпителий.

А. Антисмысловые агенты.

Термины "антисмысловой олигомер" или "антисмысловое соединение" или "антисмысловой олигонуклеотид" являются взаимозаменяемыми и относятся к последовательности циклических субъединиц, каждая из которых содержит фрагменты спаривания оснований, соединенные межсубъединичными связями, которые позволяют фрагментам спаривания оснований гибридизоваться с последовательностью-мишенью в нуклеиновой кислоте (как правило, РНК) путем спаривания оснований Уотсона-Крика, с образованием гетеродуплекса нуклеиновая кислота:олигомер в последовательности-мишени и, как правило, таким образом, предотвращением трансляции указанной РНК. Также включены способы их применения для модуляции экспрессии выбранного транскрипта AARS, такого как сплайс-вариант или протеолитический фрагмент, и/или его соответствующего полипептида.

Антисмысловые олигонуклеотиды могут содержать между примерно 8 и 40 субъединицами, как правило, примерно 8-25 субъединиц и предпочтительно примерно от 12 до 25 субъединиц. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения олигонуклеотиды могут иметь точную комплементарность последовательности-мишени или приблизительную комплементарность, как определено ниже. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения степень комплементарности между последовательностью-мишенью и антисмысловой направленной последовательностью является достаточной для образования стабильного дуплекса. Участок комплементарности антисмысловых олигомеров с последовательностью-мишенью РНК может быть не меньше 8-11 оснований, но предпочтительно содержит 12-15 оснований или более например, 12-20 оснований или 12-25 оснований, включая все целые числа между указанными диапазонами. Антисмысловой олигомер, состоящий примерно из 14-15 оснований, в целом является достаточно длинным для того, чтобы иметь уникальную комплементарную последовательность для направленности против выбранного гена AARS. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения минимальная длина комплементарных оснований может требоваться для достижения требуемой T_m связывания, как обсуждается в настоящем изобретении.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения антисмысловые олигомеры длиной в 40 оснований могут являться подходящими, где по меньшей мере минимальное число оснований, например, 10-12 оснований, являются комплементарными последовательности-мишени. В целом однако, облегченный или активный захват в клетках оптимален при длине олигомера меньше примерно 30 оснований. Для конкретных олигомеров, дополнительно описанных ниже, оптимальный баланс связывания стабильности и захвата в целом происходит при длине в 18-25 оснований. Включены антисмысловые олигомеры (например, РНК, LNA, 2'-ОМЕ, MOE), которые состоят примерно из 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 оснований, в которых по

меньшей мере примерно 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 заменимых или незаменимых оснований являются комплементарными их последовательности-мишени AARS или ее вариантам.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения антисмысловые олигомеры могут быть на 100% комплементарными последовательности-мишени нуклеиновых кислот AARS или могут включать несоответствия, например, для включения вариантов, при условии, что гетеродуплекс, образованный между олигомером и последовательностью-мишенью нуклеиновой кислоты AARS, является достаточно стабильным, чтобы являться устойчивым к действию клеточных нуклеаз и других способов деградации, которые могут происходить *in vivo*. Термин "последовательность-мишень" относится к части РНК-мишени, против которой направлен олигонуклеотид, т.е. последовательности, с которой олигонуклеотид будет гибридизоваться путем спаривания оснований комплементарной последовательности Уотсона-Крика. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения последовательность-мишень может представлять собой заменимый участок мРНК AARS (например, уникальную границу сплайсинга мРНК AARS) или может состоять из незаменимых участков мРНК.

Олигомерные каркасы, которые менее чувствительны к расщеплению нуклеазами, описаны ниже. Несоответствия, в случае их присутствия, являются менее дестабилизирующими в направлении концевых участков гибридного дуплекса по сравнению со средней частью. Количество разрешенных несоответствий будет зависеть от длины олигомера, процента пар оснований G:C в дуплексе и положения несоответствия (несоответствий) в дуплексе, в соответствии с хорошо известными правилами стабильности дуплекса. Несмотря на то что указанный антисмысловой олигомер не обязательно является на 100% комплементарным последовательности-мишени нуклеиновой кислоты AARS, он является эффективным для того, чтобы стабильно и специфично связываться с последовательностью-мишенью, приводя, таким образом, к модулированию биологической активности нуклеиновой кислоты-мишени, например, экспрессии белка (белков) AARS.

Стабильность дуплекса, образованного между олигомером и последовательностью-мишенью, представляет собой функцию T_m связывания и чувствительности дуплекса к клеточному ферментативному расщеплению. T_m антисмыслового олигонуклеотида для комплементарной последовательности РНК можно измерять с помощью общепринятых способов, таких как способы, описанные в источниках Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, pp.107-108 или Miyada C.G. and Wallace R.B., 1987, *Oligonucleotide hybridization techniques*, *Methods Enzymol.* Vol. 154, p. 94-107. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения антисмысловые олигомеры могут иметь T_m связывания для комплементарной последовательности РНК больше температуры тела, и предпочтительно, больше 50°C. T_m в диапазоне 60-80°C или более является предпочтительной. В соответствии с хорошо известными принципами, T_m олигомерного соединения для основанного на комплементарности РНК-гибрида, может быть повышена путем повышения отношения пар оснований C:G в дуплексе, и/или путем повышения длины (в парах оснований) гетеродуплекса. В то же время, в целях оптимизации клеточного поглощения, может являться предпочтительным ограничивать размер антисмыслового олигомера. По указанной причине, соединения, которые имеют высокую T_m (50°C или более) при длине 25 оснований, или менее, являются в целом предпочтительными по сравнению с теми, которые требуют более чем 25 оснований для высоких значений T_m .

Могут быть сконструированы антисмысловые олигомеры для блокировки или подавления трансляции мРНК или для подавления сплайс-процессинга природной пре-мРНК или индукции деградации мРНК-мишеней и могут называться "направленными на" или "нацеленными против" последовательности-мишени, с которой он гибридизуется. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения последовательность-мишень может включать любую кодирующую или не кодирующую последовательность мРНК транскрипта AARS и может, таким образом, находиться внутри экзона или внутри интрона. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения последовательность-мишень является относительно уникальной или исключительной среди последовательностей AARS (например, полноразмерной AARS) и является селективной в отношении уменьшения экспрессии выбранного белкового фрагмента AARS, такого как протеолитический фрагмент или сплайс-вариант. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения сайт-мишень включает 3' или 5'-сайт сплайсинга пре-процессированной мРНК или точку ветвления. Последовательность-мишень для сайта сплайсинга может включать мРНК последовательность, имеющую на 5'-конце от 1 до примерно 25 до примерно 50 пар оснований после акцепторного соединения сплайсинга или перед донорным соединением сплайсинга в препроцессированной мРНК. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения последовательность-мишень может включать границу сплайсинга альтернативно-сплайсированной мРНК AARS, такую как граница сплайсинга, которая не встречается в полноразмерной AARS или является уникальной или исключительной для указанного транскрипта, в котором она либо не встречается, либо только редко встречается в других сплайс-вариантах AARS. Олигомер более обобщенно называется "нацеленным против" биологически подходящей мишени, такой как эталонный полинуклеотид AARS, когда он нацелен против нуклеиновой кислоты-мишени таким образом, как описано в настоящем изобретении.

Олигонуклеотид, как правило, является комплементарным последовательности-мишени, такой как

ДНК- или РНК-мишень. Термины "комплементарный" и "комплементарность" относятся к полинуклеотидам (т.е. последовательностям нуклеотидов), соединенным по правилам спаривания оснований. Например, последовательность "А-Г-Т" является комплементарной последовательности "Т-С-А". Комплементарность может быть "частичной", когда только некоторые из оснований нуклеиновой кислоты не соответствуют согласно правилам спаривания оснований. Или же указанные последовательности нуклеиновых кислот могут иметь "идеальную" или "полную" комплементарность (100%). Степень комплементарности между цепями нуклеиновой кислоты оказывает значительное влияние на эффективность и силу гибридизации между цепями нуклеиновой кислоты. Тогда как идеальная комплементарность часто является желательной, некоторые варианты реализации изобретения могут включать одно или более предпочтительно 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 несоответствие в отношении последовательности-мишени. Включены вариации в любом положении олигомера. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения вариации последовательности вблизи конца олигомера в целом являются предпочтительными по сравнению с вариациями в начале последовательности и, при их наличии, как правило, составляют в пределах примерно 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида со стороны 5' и/или 3'-конца.

Термин "направленная (нацеленная) последовательность", или согласно конкретным вариантам реализации изобретения "антисмысловая направленная последовательность" относится к последовательности в олигонуклеотиде, которая является комплементарной (что означает, кроме того, по существу комплементарной) последовательности-мишени в молекуле-мишени ДНК или РНК. Целая последовательность или только часть антисмыслового соединения может быть комплементарной последовательности-мишени. Например, в олигонуклеотиде, содержащем 20-30 оснований, примерно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29 оснований могут составлять направленные последовательности, которые являются комплементарными области-мишени. Как правило, направленная последовательность образована из заменимых оснований, но, в альтернативном варианте, может быть образована из незаменимых последовательностей, которые при объединении, например, из противоположных концов олигонуклеотида, составляют последовательность, которая захватывает последовательность-мишень.

Последовательность-мишень и направленная последовательность, описаны как "комплементарные" друг другу при гибридизации в антипараллельной конфигурации. Направленная последовательность может иметь "приблизительную" или "значительную" комплементарность последовательности-мишени, но все еще функционировать в целях настоящего изобретения, т.е. она может все еще являться функционально "комплементарной". Согласно конкретным вариантам реализации изобретения олигонуклеотид может иметь не более одного несоответствия с последовательностью-мишенью из 10 нуклеотидов, и предпочтительно, не больше одного несоответствия из 20. В альтернативном варианте олигонуклеотид может являться по меньшей мере примерно на 80, 85, 90% гомологичным последовательности, и предпочтительно по меньшей мере на 95% гомологичным последовательности эталонного полинуклеотида AARS, описанного в настоящем изобретении, или его комплемента.

Олигонуклеотид "специфично гибридизуется" с интересующим полинуклеотидом, если олигомер гибридизуется с намеренным (например, эталонным полинуклеотидом AARS или его комплементом) в физиологических условиях, при этом T_m составляет по существу больше 45°C , предпочтительно по меньшей мере 50°C и как правило $60-80^{\circ}\text{C}$, или больше. Указанная гибридизация предпочтительно соответствует строгим условиям гибридизации. При конкретной ионной силе и pH, T_m представляет собой температуру, при которой 50% последовательности-мишени гибридизуется с комплементарным полинуклеотидом. Опять же, указанная гибридизация может происходить с "приблизительной" или "значительной" комплементарностью антисмыслового олигомера последовательности-мишени, также как и с точной комплементарностью.

Термины "специфично связывается" или "специфично гибридизуется" в целом относятся к олигонуклеотидному зонду или полинуклеотидной последовательности, которая не только связывается с ее предполагаемой последовательностью-мишенью гена в образце при выбранных условиях гибридизации, но и не связывается значительно с другими последовательностями-мишенями в образце и, таким образом, отличает ее предполагаемую мишень от всех других мишеней в пуле-мишени. Зонд, который специфично гибридизуется с его предполагаемой последовательностью-мишенью может также выявлять различия в концентрации при выбранных условиях гибридизации, описанных в настоящем изобретении.

"Устойчивая к действию нуклеаз" олигомерная молекула (олигомер) относится к молекуле, скелет которой является по существу устойчивым к расщеплению нуклеазами, в не гибридизованной или гибридизованной форме; общими внеклеточными и внутриклеточными нуклеазами в теле организма; т.е. олигомер мало поддается или не поддается расщеплению при нормальных условиях нуклеазами в теле организма, действию которых подвергается указанный олигомер.

"Гетеродуплекс" относится к дуплексу между олигонуклеотидом и комплементарной частью интересующего полинуклеотида, такого как ДНК- или РНК-мишень. "Устойчивый к действию нуклеаз гетеродуплекс" относится к гетеродуплексу, образованному путем связывания олигомера с комплементарной ему мишенью, таким образом, что указанный гетеродуплекс по существу является устойчивым к дегра-

дации *in vivo* внутриклеточными и внеклеточными нуклеазами, такими как РНКазы, которая способна разрезать двуцепочечные комплексы РНК/РНК или РНК/ДНК.

"Субъединица" олигонуклеотида относится к одной единице нуклеотида (или аналога нуклеотида). Термин может относиться к нуклеотидной единице, содержащей или не содержащей присоединенную межсубъединичную связь, несмотря на то, что при ссылке на "заряженную субъединицу", заряд, как правило, принадлежит межсубъединичной связи (например, фосфатной или фосфоротиоатной связи или катионной связи).

Циклические субъединицы олигонуклеотидов могут представлять собой группы на основе рибозы или другого пентозного сахара или, согласно конкретным вариантам реализации изобретения альтернативные или модифицированные группы. Примеры модифицированных олигонуклеотидных скелетов включают, но не ограничиваются перечисленными: фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, сложные фосфотриэфиры, сложные аминокислотфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат и аминокислотфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тиоалкилфосфонаты, сложные тиоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5' связи, 2'-5'-связанные их аналоги и группы, которые имеют противоположную ориентацию, где смежные пары нуклеотидных единиц связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'. Также рассматриваются пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК), запертые нуклеиновые кислоты (LNA), 2'-О-метилолигонуклеотиды (2'-ОМе), 2'-метоксиэтоксидиолонуклеотиды (МОЕ), среди других олигонуклеотидов, известных в данной области техники.

Пуриновый или пиримидиновый фрагмент спаривания оснований, как правило, представляет собой аденин, цитозин, гуанин, урацил, тимин или инозин. Также включены основания, такие как пиридин-4-он, пиридин-2-он, фенил, псевдоурацил, 2,4,6-триметилэтоксibenзол, 3-метилурацил, дигидроуридин, нафтил, аминифенил, 5-алкилцитидины (например, 5-метилцитидин), 5-алкилуридин (например, риботимидин), 5-галоуридин (например, 5-бромурин) или 6-азапиримидины или 6-алкилпиримидины (например 6-метилуридин), пропин, квеозин, 2-тиоуридин, 4-тиоуридин, вибутозин, вибутоксозин, 4-ацетилтидин, 5-(карбоксигидроксиметил)уридин, 5'-карбоксиметиламинметил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинметилуридин, β -D-галактозилквеозин, 1-метиладенозин, 1-метилюридин, 2,2-диметилгуанозин, 3-метилцитидин, 2-метиладенозин, 2-метилгуанозин, N6-метиладенозин, 7-метилгуанозин, 5-метоксиаминометил-2-тиоуридин, 5-метиламинометилуридин, 5-метилкарбонилметилкарбонилметилуридин, 5-метилоксиуридин, 5-метил-2-тиоуридин, 2-метилтио-N6-изопентениладенозин, β -D-маннозилквеозин, уридин-5-оксиуксусную кислоту, 2-тиоцитидин, треониновые производные, и т.д. (Burgin et al., 1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman & Peyman, выше). Под термином "модифицированные основания" в указанном аспекте подразумевается нуклеотидное основание, отличное от аденина (A), гуанина (G), цитозина (C), тимина (T) и урацила (U), как показано выше; указанные основания можно применять в любом положении в антисмысловой молекуле. Специалистам в данной области техники очевидно, что в зависимости от применения олигомера, Ts и Us являются взаимозаменяемыми. Например, в случае других антисмысловых химических соединений, таких как 2'-О-метильные антисмысловые олигонуклеотиды, которые являются более подобными РНК, Т основание может обозначаться как U.

Как отмечено выше, конкретные олигонуклеотиды, предложенные в настоящем изобретении, включают пептидонуклеиновые кислоты (ПНК). Пептидонуклеиновые кислоты (ПНК) представляют собой аналоги ДНК, в которых скелет является структурно гомоморфным скелету дезоксирибозы, состоящие из N-(2-аминоэтил)глициновых единиц, к которым присоединены пиримидиновые или пуриновые основания. ПНК, содержащие природные пиримидиновые и пуриновые основания, гибридизуются с комплементарными олигонуклеотидами, удовлетворяя правилам спаривания оснований Уотсона-Крика, и имитируют ДНК с точки зрения распознавания пар оснований (Egholm, Buchardt et al. 1993). Скелет ПНК образован пептидными связями вместо фосфодиэфирных связей, что делает их подходящими для применения в качестве антисмысловых агентов (см. структуру ниже). Скелет является незаряженным, что приводит к получению дуплексов ПНК/ДНК или ПНК/РНК, которые обладают большей термальной стабильностью по сравнению с нормой. ПНК не распознаются нуклеазами или протеазами.

ПНК могут быть получены синтетическим путем с использованием любого метода, известного в данной области техники. ПНК представляет собой аналог ДНК, в котором полиамидный скелет замещает традиционное фосфатно-рибозное кольцо ДНК. Несмотря на радикальные структурные изменения природной структуры, ПНК способна к последовательность-специфическому связыванию с ДНК в спиральной форме или РНК. Характеристики ПНК включают высокую аффинность связывания с комплементарными ДНК или РНК, дестабилизирующий эффект, вызванный несоответствием одного основания, устойчивость к нуклеазам и протеазам, гибридизация с ДНК или РНК, независимо от концентрации соли, и формирование триплекса с гомопуриновой ДНК. Panagene™ разработали их собственные Bts-ПНК мономеры (Bts; бензотиазол-2-сульфонильная группа) и запатентованный способ олигомеризации. Олигомеризация ПНК с использованием Bts-ПНК мономеров состоит из повторяющихся циклов удаления за-

щитной группы, сочетания и экпирования. Патенты компании Rapagene, относящиеся к указанной технологии, включают патент США 6969766, патент США 7211668, патент США 7022851, патент США 7125994, патент США 7145006 и патент США 7179896. Примеры патентов США, в которых описаны способы получения ПНК-соединений включают, но не ограничиваются перечисленными: патенты США № 5539082; 5714331 и 5719262, каждый из которых включен в настоящее изобретение посредством ссылки. Дополнительное описание ПНК-соединений можно найти в источнике Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497.

Также включены субъединицы "запертых нуклеиновых кислот" (LNA). Структуры LNA известны в данной области техники: например, Wengel, et al., Chemical Communications (1998), 455; Tetrahedron (1998) 54, 3607, и Accounts of Chem. Research (1999), 32, 301; Obika, et al., Tetrahedron Letters (1997), 38, 8735; (1998) 39, 5401, и Bioorganic Medicinal Chemistry (2008), 16, 9230.

Олигонуклеотиды могут включать одну или более LNA; в некоторых случаях, соединения могут быть полностью составлены из LNA. Способы синтеза отдельных нуклеозидных субъединиц LNA и их включения в олигонуклеотиды известны в данной области техники: патенты США 7572582; 7569575; 7084125; 7060809; 7053207; 7034133; 6794499 и 6670461. Типичные межсубъединичные линкеры включают сложные фосфодиефирные и фосфоротиоатные фрагменты. В альтернативном варианте можно применять не содержащие фосфор линкеры. Предпочтительный вариант реализации изобретения представляет собой LNA-содержащее соединение, где каждая субъединица LNA отделена субъединицей ДНК (т.е. нуклеотидом дезоксирибозы). Другие предпочтительные соединения состоят из чередующихся LNA и ДНК субъединиц, где межсубъединичный линкер представляет собой фосфоротиоат.

Конкретные олигонуклеотиды могут содержать морфолиновые субъединицы, содержащие фрагменты спаривания оснований, соединенные не заряженными или по существу не заряженными связями. Термины "морфолиновый олигомер" или "РМО" (фосфорамидат- или фосфородиамидатморфолиновый олигомер) относятся к аналогу олигонуклеотида, состоящему из структур морфолиновых субъединиц, где (i) указанные структуры связаны вместе с помощью фосфор-содержащих связей, длиной от одного до трех атомов, предпочтительно, два атома в длину, и предпочтительно, незаряженными или катионными, соединяющими атом азота морфолиновой группы одной субъединицы с 5' экзоциклическим атомом углерода соседней субъединицы, и (ii) каждое морфолиновое кольцо содержит пурин или пиримидин или эквивалентный фрагмент спаривания оснований, эффективный для связывания с помощью специфических для оснований водородных связей, с основаниями в полинуклеотиде.

Указанные связи могут быть модифицированы при условии, что они не препятствуют связыванию или активности. Например, кислород, присоединенный к фосфору, может содержать в качестве заместителя серу (тиофосфородиамидат). 5'-кислород может содержать в качестве заместителя amino или amino, содержащий в качестве заместителя низший алкил. Азот боковой цепи, присоединенный к фосфору, может являться незамещенным, монозамещенным или дизамещенным (необязательно замещенным) низшим алкилом. Фрагмент, спариваемый с пуриновым или пиримидиновым основанием, как правило, представляет собой аденин, цитозин, гуанин, урацил, тимин или инозин. Синтез, структуры и характеристики связывания морфолиновых олигомеров подробно описаны в патентах США № 5698685, 5217866, 5142047, 5034506, 5166315, 5521063 и 5506337 и заявке РСТ № РСТ/US07/11435 (катионные связи) и патенте США 08/012804 (улучшенный синтез), все из которых включены в настоящее изобретение посредством ссылки.

Морфолиновые субъединицы также могут быть связаны с помощью межсубъединичных связей не на основе фосфора, как дополнительно описано ниже, где по меньшей мере одна связь является модифицированной катионной группой боковой цепи, как описано выше. Можно применять другие связи олигонуклеотидных аналогов, которые являются незаряженными в своем немодифицированном состоянии, но которые могут также содержать аминный заместитель группы боковой цепи. Например, 5'-атом азота на морфолиновом кольце может использоваться в сульфамидной связи или мочевиновой связи (где фосфор замещен атомом углерода или серы соответственно) и модифицированные аналогичным 5'-атому азота в структуре (b3) образом, выше.

Конкретные варианты реализации изобретения включают по существу незаряженные морфолиновые олигомеры, такие как по существу незаряженный фосфородиамидат-связанный морфолиновый олигомер. По существу незаряженный, содержащий фосфор скелет в аналоге олигонуклеотида представляет собой скелет, в котором большинство субъединичных связей, например, между 50-100%, как правило по меньшей мере от 60 до 100% или 75 или 80% его связей, являются незаряженными при физиологических значениях pH и содержат один атом фосфора. Примеры морфолиновых олигонуклеотидов, имеющих фосфор-содержащие связи скелета, включают фосфороамидат- и фосфородиамидат-связанные морфолиновые олигонуклеотиды.

Конкретные варианты реализации изобретения могут включать положительно заряженные группы, предпочтительно, примерно в 10-50% связей их скелета.

Свойства субъединиц, обусловленные присутствием морфолино-, включают, например, способность быть связанными в олигомерной форме с помощью стабильных, незаряженных или положительно заряженных связей скелета, способность поддерживать нуклеотидное основание (например, аденин, ци-

тозин, гуанин, тимидин, урацил и гипоксантин) таким образом, что образующийся полимер может гибридизоваться с комплементарной нуклеиновой кислотой-мишенью, включая РНК-мишень, значения T_m выше примерно 45°C в относительно коротких олигонуклеотидах (например, 10-15 оснований), способность олигонуклеотида активно или пассивно транспортироваться в клетки млекопитающих и способность гетеродуплекса антисмысловой олигонуклеотид:РНК быть устойчивым к деградации РНКазой и РНКазойН соответственно.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения по существу незаряженный олигонуклеотид может быть модифицирован для включения заряженных связей, например, вплоть до примерно 1 на каждую 2-5 незаряженных связей, например, примерно 4-5 на каждые 10 незаряженных связей. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения оптимальное улучшение антисмысловой активности может наблюдаться, когда примерно 25% связей скелета являются катионными. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения усиление может наблюдаться при малом количестве, например, 10-20%, катионных связей или где число катионных связей находится в диапазоне 50-80%, например, примерно 60%. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения катионные заряды скелета могут быть дополнительно усилены путем распределения объема зарядов вблизи связей "центральной области" скелета антисмыслового олигонуклеотида, например, в 20-мерном олигонуклеотиде с 8 катионными связями скелета, по меньшей мере 70% указанных заряженных связей которого расположены в 10 наиболее центральных связях.

Олигонуклеотиды, которые направлены на одну или более частей полинуклеотида эталонной последовательности AARS или ее комплемента можно применять в любых терапевтических, диагностических способах или способах скрининга лекарственных средств, описанных в настоящем изобретении и очевидных специалистам в данной области техники.

В. Агенты РНК-интерференции.

Конкретные варианты реализации изобретения относятся к агентам на основе интерферирующей РНК (РНКи), которые направлены на один или более мРНК транскриптов эталонного полинуклеотида аминоксил-тРНК-синтазы (AARS), включая его фрагменты и сплайс-варианты. Также включены способы их применения для модуляции уровня выбранного транскрипта AARS, такого как сплайс-вариант AARS или эндогенный протеолитический фрагмент.

Термин "двухцепочечный" обозначает две отдельные цепочки нуклеиновых кислот, содержащие участок, в котором по меньшей мере часть цепочек являются достаточной комплементарными для образования водородных связей и формирования дуплексной структуры. Термин "дуплекс" или "дуплексная структура" относится к участку двухцепочечной молекулы, где две отдельные цепочки являются по существу комплементарными и, таким образом, гибридизуются друг с другом. "дцРНК" относится к молекуле рибонуклеиновой кислоты, имеющей дуплексную структуру, содержащей две комплементарные и антипараллельные цепочки нуклеиновых кислот (т.е. смысловая и антисмысловая цепочки). Не все нуклеотиды дцРНК должны иметь пары оснований Уотсона-Крика; две цепи РНК могут являться по существу комплементарными. Цепи РНК могут иметь одинаковое или разное число нуклеотидов.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения дцРНК представляет собой или включает участок, который является, по меньшей мере, частично комплементарным РНК-мишени. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения дцРНК является полностью комплементарной РНК-мишени. Нет необходимости в идеальной комплементарности между дцРНК и мишенью, но соответствие должно быть достаточным для возможности дцРНК или продукта ее расщепления, направлять специфический сайленсинг последовательности, например, РНКи-расщепление РНК-мишени. Комплементарность или степень гомологии с цепью-мишенью, как правило, является наиболее критичной в антисмысловой цепи. Тогда как идеальная комплементарность, в частности в антисмысловой цепи, часто является желательной, некоторые варианты реализации изобретения могут включать одно или более, но предпочтительно 6, 5, 4, 3, 2 или менее, несоответствий относительно РНК-мишени. Несоответствия наиболее допустимы в концевых участках и, при наличии, предпочтительно находятся в концевом участке или участках, например, в пределах 6, 5, 4 или 3 нуклеотидов 5' и/или 3' конца. Смысловая цепочка должна быть только по существу комплементарной с антисмысловой цепью для поддержания общей двухцепочечности молекулы.

В настоящем изобретении "модифицированная дцРНК" относится к молекуле дцРНК, которая содержит по меньшей мере одно изменение, которое делает ее более устойчивой к действию нуклеаз (например, протеинкиназ) по сравнению с идентичной молекулой дцРНК, которая распознает эту же РНК-мишень. Модифицированные дцРНК могут содержать одноцепочечный нуклеотидный "липкий конец" и/или по меньшей мере один замещенный нуклеотид.

В настоящем изобретении нуклеотидный "липкий конец" относится к неспаренному нуклеотиду или нуклеотидам, которые выступают за пределы дуплексной структуры, когда 3'-конец цепи РНК выходит за пределы 5'-конца другой комплементарной цепи, или наоборот. "Тупой" или "тупой конец" означает отсутствие неспаренных нуклеотидов на указанном конце дцРНК, т.е. отсутствие нуклеотидного "липкого конца". дцРНК с "тупыми концами" представляет собой дцРНК, которая является двухцепочечной по всей длине, т.е. не имеет нуклеотидного "липкого конца" ни на одном конце молекулы.

Термин "концевая пара оснований" в настоящем изобретении относится к последней паре оснований нуклеотидов на одном конце дуплексного участка двуцепочечной молекулы. Например, если дцРНК или другая молекула представляет собой молекулу с тупыми концами (т.е. не имеет нуклеотидных "липких концов"), последние пары оснований нуклеотидов на обоих концах молекулы представляют собой концевые пары оснований. Когда дцРНК или другая молекула имеет нуклеотидный "липкий конец" на одном, или на обоих, концах дуплексной структуры, последняя пара (пары) оснований нуклеотидов, непосредственно прилегающая к нуклеотидному "липкому концу (концам)" представляет собой концевую пару оснований на указанном конце (концах) молекулы.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения способы, предложенные в настоящем изобретении, могут использовать двуцепочечную молекулу рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) в качестве модулирующего агента, для уменьшения экспрессии транскрипта AARS, такого как выбранный фрагмент или сплайс-вариант. дцРНК в целом включает две отдельные цепочки. Одна цепочка дцРНК содержит нуклеотидную последовательность, которая является по существу идентичной части гена-мишени или участка-мишени ("смысловая" цепочка), и другая цепочка ("комплементарная" или "антисмысловая" цепочка) содержит последовательность, которая является по существу комплементарной части участка-мишени. Цепочки являются достаточно комплементарными для гибридизации с образованием дуплексной структуры. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения комплементарная цепочка РНК может иметь длину менее 30 нуклеотидов, менее чем 25 нуклеотидов или даже от 19 до 24 нуклеотидов. Согласно конкретным аспектам изобретения, комплементарная нуклеотидная последовательность может иметь длину 20-23 нуклеотидов или 22 нуклеотида.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения по меньшей мере одна из цепочек РНК содержит нуклеотидный "липкий конец", длина которого составляет от 1 до 4 нуклеотидов. Согласно другим вариантам реализации изобретения дцРНК также может содержать по меньшей мере один химически модифицированный нуклеотид. Согласно конкретным аспектам изобретения, дцРНК, содержащая одноцепочечный "липкий конец", состоящий из 1-4 нуклеотидов, может включать молекулу, где неспаренный нуклеотид одноцепочечного "липкого конца", который непосредственно прилегает к концевой нуклеотидной паре, содержит пуриновое основание. Согласно другим аспектам, последние комплементарные нуклеотидные пары на обоих концах дцРНК представляют собой пары G-C, или по меньшей мере две из последних четырех концевых пар нуклеотидов представляют собой пары G-C.

Конкретные варианты реализации настоящего изобретения могут включать микро-РНК. Микро-РНК представляют собой большую группу малых РНК, продуцирующихся в естественных условиях в организмах, некоторые из которых регулируют экспрессию генов-мишеней. Микро-РНК образуются из одноцепочечного транскрипта-предшественника, содержащего шпильки, состоящего примерно из 70 нуклеотидов, с помощью Dicer. (V. Ambros et al., Current Biology 13:807, 2003). Конкретные микро-РНК могут транскрибироваться как предшественники РНК, содержащие шпильки, которые затем подвергаются процессингу с помощью фермента Dicer с образованием их зрелых форм.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения также можно применять малые интерферирующие РНК (миРНК). Согласно конкретным вариантам реализации изобретения первая цепочка двуцепочечного олигонуклеотида содержит на два больше нуклеотидных остатка по сравнению со второй цепочкой. Согласно другим вариантам реализации изобретения первая цепочка и вторая цепочка имеют одинаковое количество нуклеотидов; однако, первая и вторая цепочки могут быть смещены таким образом, что два концевых нуклеотида на первой и второй цепочке не являются спаренными с остатком на комплементарной цепочке. В конкретных примерах два нуклеотида, которые не являются спаренными, представляют собой остатки тимидина.

Также включены короткие РНК, содержащие шпильки (shРНК), и микроРНК (miРНК). Двуцепочечная структура shРНК образована одной самокомплементарной цепочкой РНК, и образование дуплекса РНК может инициироваться либо внутри, либо снаружи клетки. МикроРНК (miРНК) представляют собой малые некодирующие РНК, состоящие из 20-22 нуклеотидов, как правило, вырезанных самогибридирующихся структур предшественника РНК, состоящих из ~70 нуклеотидов и известных как pre-miРНК.

В примерах, когда модулирующий агент содержит миРНК, указанный агент должен включать участок достаточной гомологии с участком-мишенью и иметь достаточную длину в пересчете на нуклеотиды, таким образом, что миРНК-агент или его фрагмент, может опосредовать подавление РНК-мишени. Необходимо понимать, что термин "рибонуклеотид" или "нуклеотид" может также относиться, в случае модифицированных РНК или имитатора нуклеотида, к модифицированному нуклеотиду или фрагменту замещения имитатором в одном или более положениях. Таким образом, миРНК-агент представляет собой или включает участок, который является, по меньшей мере, частично комплементарными РНК-мишени, как описано в настоящем изобретении.

Кроме того, модулирующий миРНК-агент может быть модифицирован или включать имитаторы нуклеотидов.

Одноцепочечные участки миРНК-агента могут быть модифицированы или включать имитаторы нуклеотидов, например, неспаренный участок или участки структуры "шпильки", например, участок,

который связывает два комплементарных участка, может иметь модификации или содержать имитаторы нуклеозидов. Также применимы модификации для стабилизации одного или более 3'- или 5'-концов мРНК-агента, например, против действия экзонуклеаз или для облегчения входа антисмыслового мРНК-агента в RISC. Модификации могут включать С3 (или С6, С7, С12) аминокислоты, тиоловые линкеры, карбоксильные линкеры, не нуклеотидные спейсеры (С3, С6, С9, С12, без основания, триэтил-глицеролиевые, гексаэтилглицеролиевые), специальные биотиновые или флуоресцеиновые реагенты, которые становятся фосфорамидитами и которые содержат другую ДМТ-защищенную гидроксильную группу, позволяя множественные сочетания во время синтеза РНК.

мРНК агенты могут включать, например, молекулы, которые являются достаточно длинными для возбуждения ответа интерферона (которые могут расщепляться Dicer (Bernstein et al., 2001. Nature, 409:363-366) и которые могут входить в RISC (РНК-индуцированный комплекс сайлансинга)), кроме молекул, которые являются достаточно короткими и не возбуждают ответ интерферона (которые также могут расщепляться Dicer и/или входить в RISC), например, молекулы, которые имеют размер, позволяющий им входить в RISC, например, молекулы, которые похожи на продукты расщепления Dicer. Модулирующие мРНК-агенты или продукты их расщепления, могут подавлять ген-мишень, например, путем индуцирования РНК-мишени, предпочтительно АARS-мишени, такой как выбранный сплайс-вариант.

Каждая цепочка мРНК-агента может быть равна, или составлять менее 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16 или 15 нуклеотидов в длину. Длина цепочки предпочтительно составляет по меньшей мере 19 нуклеотидов. Например, длина каждой цепочки может составлять между 21 и 25 нуклеотидами. Предпочтительные мРНК-агенты имеют дуплексный участок, состоящий из 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 пар нуклеотидов и один или более "липких концов", предпочтительно один или два 3'-"липкий конец", состоящих из 2-3 нуклеотидов.

Помимо гомологии РНК-мишени и способности подавлять ген-мишень, мРНК-агент может обладать одним или более из следующих свойств: он может, несмотря на модификации даже очень большого числа или всех нуклеозидов, содержать антисмысловую цепочку, которая может предоставлять основания (или модифицированные основания) с подходящим трехмерным каркасом таким образом, что она способна формировать правильное спаривание оснований и образовывать дуплексную структуру с гомологичной РНК-мишенью, которая является достаточной для того, чтобы обеспечить подавление мишени, например, путем расщепления РНК-мишени; он может, несмотря на модификации даже очень большого числа или всех нуклеозидов, все еще обладать "РНК-подобными" свойствами, т.е. он может обладать всеми структурными, химическими и физическими свойствами, присущими молекуле РНК, несмотря на то, что он состоит не только из, или даже только частично состоит из, рибонуклеотидов. Например, мРНК-агент может содержать, например, смысловую и/или антисмысловую цепочку, в которой все сахара нуклеотидов содержат, например, 2'-фтор вместо 2'-гидроксила. Указанный дезоксирибонуклеотид-содержащий агент все еще может быть способен проявлять РНК-подобные свойства. Без ограничения конкретной теорией, электроотрицательный фтор предпочтительно имеет аксиальную ориентацию при присоединении к положению С2' рибозы. Указанное пространственное предпочтение фтора, в свою очередь, может заставлять сахар образовывать С3'-концевой излом плоскости углеводного кольца. Это такой же тип излома, который наблюдается в молекулах РНК и дает начало характерному для РНК типу спирали семейства А. Кроме того, так как фтор представляет собой хороший акцептор водородной связи, он может принимать участие в таких же взаимодействиях водородного связывания с молекулами воды, которые, как известно, стабилизируют структуры РНК. В целом является предпочтительным, что модифицированный фрагмент в положении 2' сахара является способным участвовать в Н-связывании, которое является более характерным для ОН-фрагмента рибонуклеотида, чем для Н-фрагмента дезоксирибонуклеотида.

"Одноцепочечный РНК-агент" в настоящем изобретении, представляет собой РНК-агент, который состоит из одноцепочечной молекулы. Он может включать дуплексный участок, образованный путем внутрицепочечного спаривания, например, он может представлять собой, или включать, структуру "шпильки" или "ручки сковороды". Одноцепочечные РНК модулирующие агенты предпочтительно являются антисмысловыми по отношению к молекуле-мишени. Одноцепочечный РНК-агент должен быть достаточно длинным для того, чтобы он мог входить в RISC и принимать участие в RISC-опосредованном расщеплении мРНК-мишени. Длина одноцепочечного РНК агента составляет по меньшей мере 14 и более предпочтительно по меньшей мере 15, 20, 25, 29, 35, 40 или 50 нуклеотидов. Его длина предпочтительно составляет менее чем 200, 100 или 60 нуклеотидов.

Модулирующие РНК-агенты, содержащие шпильки, могут иметь дуплексный участок, который равен или по меньшей мере составляет 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидных пар. Дуплексный участок может предпочтительно быть равным или составлять менее чем 200, 100 или 50, в длину. Конкретные диапазоны длины дуплексного участка составляют от 15-30, 17 до 23, 19-23 и 19-21 нуклеотидных пар. Шпилька может иметь одноцепочечный "липкий конец" или концевой неспаренный участок, предпочтительно 3' и предпочтительно на антисмысловой стороне шпильки. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения "липкие концы" составляют 2-3 нуклеотида в длину.

Конкретные модулирующие агенты, используемые в соответствии со способами, предложенными в настоящем изобретении, могут включать РНК-олигонуклеотиды, такие как гибридные олигонуклеотиды или "химеры", которые содержат два или более химически отдельных участка, каждый из которых состоит по меньшей мере из одной мономерной единицы, т.е. нуклеотида в случае олигонуклеотидного соединения. Указанные олигонуклеотиды, как правило, содержат по меньшей мере один участок, модифицированный таким образом, что обеспечивает повышенную устойчивость к деградации указанного олигонуклеотида под действием нуклеаз, повышение клеточного поглощения и/или повышение аффинности связывания с нуклеиновой кислотой-мишенью. Таким образом, сравнимые результаты часто могут быть получены при использовании более коротких олигонуклеотидов, когда используются гибридные олигонуклеотиды по сравнению с фосфоротиоатными олигодезоксинуклеотидами. Гибридные олигонуклеотиды могут быть образованы как составные структуры из двух или более олигонуклеотидов, модифицированных олигонуклеотидов, олигонуклеотидов и/или миметиков олигонуклеотидов, описанных выше. Указанные олигонуклеотиды также называются в данной области техники гибридами или гапмерами. Примеры патентов США, в которых описаны способы получения таких гибридных структур, включают, но не ограничиваются перечисленными: патенты США № 5013830; 5149797; 5220007; 5256775; 5366878; 5403711; 5491133; 5565350; 5623065; 5652355; 5652356; 5700922 и 5955589, каждый из которых включен в настоящее изобретение посредством ссылки. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения гибридный олигонуклеотид представляет собой РНК-ДНК, ДНК-РНК, РНК-ДНК-РНК, ДНК-РНК-ДНК или РНК-ДНК-РНК-ДНК, где длина указанного олигонуклеотида составляет между 5 и 60 нуклеотидами.

Согласно одному аспекту согласно изобретению, РНК-агенты относятся к олигонуклеотиду, содержащему по меньшей мере один лиганд, связанный с измененным или неприродным нуклеотидным основанием. Большое количество соединений могут функционировать как измененное основание. Структура измененного основания является важной, при условии, что измененное основание по существу не препятствует связыванию олигонуклеотида с его мишенью, например, мРНК. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения измененное основание представляет собой дифтортолил, нитропирролил, нитроимидазол, нитроиндол, нафталенил, антраценил, пиридилил, хиолинил, пиренил или бивалентный радикал любого из неприродных нуклеотидных оснований, описанных в настоящем изобретении. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения неприродные нуклеотидные основания представляют собой дифтортолил, нитропирролил или нитроимидазол. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения неприродное нуклеотидное основание представляет собой дифтортолил. Широкое разнообразие лигандов известно в данной области техники и включено согласно настоящему изобретению. Например, лиганд может представлять собой стероид, желчную кислоту, липид, фолиевую кислоту, пиридоксал, В12, рибофлавин, биотин, ароматическое соединение, полициклическое соединение, краун-эфир, интеркалятор, расщепляющую молекулу, связывающийся с белком агент или углевод. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения лиганд представляет собой стероидное или ароматическое соединение. В конкретных примерах лиганд представляет собой холестерил.

Согласно другим вариантам реализации изобретения РНК-агент представляет собой олигонуклеотид, связанный с лигандом в целях улучшения клеточной направленности и захвата. Например, РНК-агент может быть связан с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В качестве дополнительного примера, РНК-агент может быть связан со специфической лиганд-связывающей молекулой, такой как полипептид или фрагмент полипептида, который специфично связывается с конкретным рецептором клеточной поверхности.

Согласно другим вариантам реализации изобретения модулирующий агент содержит неприродное нуклеотидное основание, описанное в настоящем изобретении. В конкретных примерах, фрагмент рибозного сахара, который в природе встречается в нуклеозидах, замещен на гексозный сахар. Согласно конкретным аспектам изобретения, гексозный сахар представляет собой аллозу, альтрозу, глюкозу, маннозу, гулозу, идозу, галактозу, талозу или их производное. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения гексоза представляет собой D-гексозу. В конкретных примерах, рибозный сахарный фрагмент, который в природе встречается в нуклеозидах, замещен на полициклическое гетероалкильное кольцо или циклогексенильную группу. В конкретных примерах, полициклическая гетероалкильная группа представляет собой бициклическое кольцо, содержащее один атом кислорода в кольце. В конкретных примерах, полициклическая гетероалкильная группа представляет собой бицикло[2.2.1]гептан, бицикло[3.2.1]октан или бицикло[3.3.1]нонан. Примеры модифицированных РНК-агентов также включают олигонуклеотиды, содержащие модифицированные скелеты или неприродные межнуклеозидные связи, описанные в настоящем изобретении.

Настоящее изобретение также включает использующие олигонуклеотиды рибозимы. Синтетические молекулы РНК и их производные, которые могут катализировать высокоспецифичные эндорибонуклеазные активности, известны как рибозимы. (см., например, патент США № 5543508, Haseloff et al., и патент США № 5545729, Goodchild et al.). Реакции расщепления катализируются самими молекулами РНК. В природных молекулах РНК сайты аутокатализируемого расщепления локализованы в высококонсервативных участках вторичной структуры РНК (Buzayan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1986,

83, 8859; Forster et al., *Cell*, 1987, 50, 9). Природные аутокаталитические молекулы РНК были модифицированы для генерации рибозимов, которые могут быть направлены на конкретную клеточную или патогенную молекулу РНК с высокой степенью специфичности. Таким образом, рибозимы служат таким же общим целям, как и антисмысловые олигонуклеотиды (т.е. модуляции экспрессии конкретного гена) и, подобно олигонуклеотидам, представляют собой нуклеиновые кислоты, значительная часть которых является одноцепочечной.

В конкретных примерах, РНК-агенты или антисмысловые олигонуклеотиды для применения в способах, предложенных в настоящем изобретении, могут быть модифицированы с помощью группы, не являющейся лигандом. Ряд молекул, не являющихся лигандами, конъюгировали с олигонуклеотидами для повышения активности, клеточного распределения, клеточной направленности или клеточного поглощения указанного олигонуклеотида, и способы осуществления указанных конъюгаций доступны в специальной литературе. Указанные фрагменты, не являющиеся лигандом, включают липидные фрагменты, такие как холестерин (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), аргинин-богатые пептиды, холевая кислота (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), тиозфир, например, гексил-5-тритилтиол (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), алифатическая цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например, дигексадецил-гас-глицерин или триэтиламмония 1,2-ди-О-гексадецил-гас-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969) или уксусная кислота адамантана (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229) или октадециламиновый или гексиламинокарбонилостероидный фрагмент (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Примеры патентов США, в которых описаны способы получения указанных олигонуклеотидных конъюгатов, перечислены выше. Типичные протоколы конъюгации включают синтез олигонуклеотида, содержащего аминоклипер в одном или более положениях последовательности. Аминогруппа затем подвергается реакции с молекулой для конъюгации, с использованием соответствующих реагентов для сочетания и активации. Реакция конъюгации может осуществляться либо с олигонуклеотидом, все еще связанным с твердым носителем, или после ухода олигонуклеотида в фазу раствора. Очистка олигонуклеотидного конъюгата с помощью ЖХВД, как правило, приводит к получению чистого конъюгата.

Дополнительные примеры РНК-агентов могут быть найдены в публикациях заявок на патент США № 2007/0275465, 2007/0054279, 2006/0287260, 2006/0035254, 2006/0008822, которые включены посредством ссылки. Также включены векторные системы доставки, которые способны экспрессировать направленные на AARS последовательности, описанные в настоящем изобретении. Включены векторы, которые экспрессируют миРНК или другие образующие дуплексы молекулы интерферирующей РНК.

Система векторной конструкции или система конструкции на основе нуклеиновой кислоты может включать единственный вектор или плазмиду, два или более вектора или плазмиды, которые вместе содержат тотальную ДНК для введения в геном хозяйской клетки или транспозон. Выбор вектора, как правило, зависит от совместимости вектора с хозяйской клеткой, в которую предполагается вводить указанный вектор. В настоящем случае векторная конструкция или конструкция на основе нуклеиновой кислоты предпочтительно представляет собой конструкцию, которая является эффективно функциональной в клетке млекопитающих, такой как мышечная клетка. Вектор также может включать селективный маркер, такой как ген устойчивости к антибиотику или лекарственной устойчивости или репортерный ген (т.е. зеленый флуоресцентный белок, люцифераза), которые можно применять для селекции или идентификации подходящих трансформантов или трансфектантов. Типичные системы доставки могут включать вирусные векторные системы (т.е. опосредованная вирусом трансдукция) включая, но не ограничиваясь перечисленными: ретровирусные (например, лентивирусные) векторы, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы и герпес-вирусные векторы, среди прочих, известных в данной области техники.

XI. Разработка лекарственных средств.

Конкретные варианты реализации изобретения относятся к применению полипептидов, антител или полинуклеотидов AARS для разработки лекарственных средств, как правило, для идентификации агентов, которые модулируют один или более неканонических видов активности эталонного полипептида AARS, например, белкового фрагмента AARS. Например, конкретные варианты реализации изобретения включают способы идентификации одного или более "клеточных партнеров по связыванию" эталонного полипептида AARS, таких как клеточный белок, липид, нуклеиновая кислота или другие молекулы хозяина, которые непосредственно или физически взаимодействуют с указанным полипептидом AARS. Конкретные примеры включают, например, рецепторы клеточной поверхности, такие как рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR), домены белок-белкового взаимодействия и их внеклеточные или внутриклеточные домены.

Также предусмотрены способы идентификации хозяйской молекулы, которая принимает участие в

одном или более видов неканонической активности полипептида AARS, включая молекулы, которые прямо или не прямо взаимодействуют с клеточным партнером по связыванию и либо регулирует его роль в неканонической активности, либо регулируются партнером по связыванию. Такие молекулы хозяина включают компоненты как предшествующих, так и последующих этапов неканонического пути по отношению к этапу взаимодействия клеточного партнера по связыванию/белка AARS, как правило, связанных примерно с 1, 2, 3, 4, 5 или более определяемыми этапами пути.

Конкретные аспекты включают способы идентификации соединения (например, полипептида) или другого агента, который проявляет агонизм или антагонизм в отношении неканонической активности эталонного полипептида AARS или его активного варианта, например, путем взаимодействия с полипептидом AARS и/или одним или более из его клеточных партнеров по связыванию. Также предусмотрены способы идентификации агентов, которые модулируют экспрессию (например, сплайсинг) сплайс-вариантов AARS или модулируют активность протеазы, которая в противном случае регулирует продукцию эндогенных белковых фрагментов AARS (резектинов) на уровне белка.

Конкретные варианты реализации изобретения таким образом включают способы идентификации партнера по связыванию эталонного полипептида AARS, включающие а) объединение полипептида AARS с биологическим образцом в подходящих условиях и б) детектирование специфического связывания полипептида AARS с указанным партнером по связыванию, и идентификацию на основании предшествующих этапов партнера по связыванию, который специфично связывается с эталонным полипептидом AARS. Также включены способы скрининга соединения, которое специфично связывается с эталонным полипептидом AARS или партнером по связыванию полипептида AARS, включающие а) объединение полипептида или партнера по связыванию с по меньшей мере одним исследуемым соединением в подходящих условиях и б) детектирование связывания полипептида или партнера по связыванию с исследуемым соединением, и таким образом, идентификацию соединения, которое специфично связывается с полипептидом или его партнером по связыванию. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения соединение представляет собой полипептид или пептид. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения соединение представляет собой низкомолекулярное или другое (например, небелковое) химическое соединение. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения соединение представляет собой пептидомиметик.

Любой способ, подходящий для детектирования белок-белковых взаимодействий, может использоваться для идентификации клеточных белков, которые взаимодействуют с эталонным полипептидом AARS, с одним или более его клеточными партнерами по связыванию, или обоими. Примеры обычных способов, которые можно применять, включают совместную иммунопреципитацию, перекрестное связывание и совместную очистку с помощью градиентов или хроматографических колонок клеточных лизатов или белков, полученных из клеточных лизатов, главным образом для идентификации белков в лизате, которые взаимодействуют с полипептидом AARS.

Согласно указанным и связанным вариантам реализации изобретения по меньшей мере часть аминокислотной последовательности белка, который взаимодействует с полипептидом AARS, или его партнером по связыванию, может быть выявлена с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области техники, таких как метод расщепления по Эдману. См., например, Creighton Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N.Y., p. 34-49, 1983. Полученная аминокислотная последовательность может использоваться в качестве направляющей для генерации смесей олигонуклеотидов, которые можно применять для скрининга на предмет последовательности гена, кодирующей указанные белки. Скрининг может осуществляться, например, с помощью методов стандартной гибридизации или ПЦР, описанных в настоящем изобретении и известных в данной области техники. Методы получения олигонуклеотидных смесей и скрининга хорошо известны. См., например, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989; и Innis et al., eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, Inc., New York, 1990.

Кроме того, способы одновременно можно применять для идентификации генов, кодирующих партнеров по связыванию или других полипептидов. Указанные способы включают, например, зондирование библиотеки экспрессии, в соответствии со способом, аналогичным хорошо известному методу зондирования с помощью антител библиотеки лямбда-gt11, с использованием меченного белка или другого полипептида, пептида или слитого белка AARS, например, варианта полипептида AARS или домена AARS, слитого с маркером (например, ферментом, фтором, люминесцентным белком или красителем) или доменом Ig-Fc.

Один способ, позволяющий выявлять белковые взаимодействия *in vivo* - двугибридная система - подробно описан, исключительно в качестве иллюстрации, а не в целях ограничения. Был описан один пример указанной системы (Chien et al., PNAS USA 88:9578-9582, 1991), который можно приобрести в компании Clontech (Пало-Альто, Калифорния).

Вкратце, при использовании такой системы, могут быть сконструированы плазмиды, которые кодируют два гибридных белка: одна плазида состоит из нуклеотидов, кодирующих ДНК-связывающий домен белка активации транскрипции, слитого с эталонной нуклеотидной последовательностью AARS (или, согласно конкретным вариантам реализации изобретения его партнера по связыванию) или ее вари-

антом, и другая плазмида состоит из нуклеотидов, кодирующих домен активации белка активации транскрипции, слитый с кДНК (или набором кДНК), кодирующей неизвестный белок (белки), которые были рекомбинантно встроены в плазмиду как часть библиотеки кДНК. Плазмида слияния с ДНК-связывающим доменом и библиотека активатора кДНК могут быть трансформированы в штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, который содержит репортерный ген (например, HBS или lacZ), регуляторная область которого содержит сайт связывания активатора транскрипции. Каждый слитый белок отдельно не может активировать транскрипцию репортерного гена: гибрид ДНК-связывающего домена не может активировать транскрипцию репортерного гена, так как он не обеспечивает функцию активации, и гибридный домен активации не может активировать транскрипцию репортерного гена, так как он не может располагаться на сайтах связывания активатора. Взаимодействие двух слитых белков восстанавливает функциональный белок-активатор и приводит к экспрессии репортерного гена, который выявляется с помощью анализа продукта репортерного гена.

Двугибридная система или другие подобные методы можно применять для скрининга библиотеки домена активации в поисках белков, которые взаимодействуют с генным продуктом - "приманкой". В качестве примера, но не в качестве ограничения, может использоваться эталонный полипептид или вариант AARS в качестве генного продукта - "приманки". Партнер по связыванию AARS также может использоваться в качестве генного продукта - "приманки". Общая геномная или кДНК-последовательность сливается с ДНК, кодирующей домен активации. Указанная библиотека и плазмида, кодирующая гибрид генного продукта "приманки" AARS, слитой с ДНК-связывающим доменом, совместно трансформируется в дрожжевой репортерный штамм и полученные трансформанты подвергаются скринингу для поиска экспрессирующих репортерный ген.

Библиотека кДНК клеточной линии, в которой предстоит детектировать белки, которые взаимодействуют с генным продуктом - "приманкой" AARS, может быть создана с использованием стандартных способов, используемых в данной области техники. Например, фрагменты кДНК могут быть встроены в вектор таким образом, что они трансляционно слиты с доменом активации транскрипции GAL4. Указанная библиотека может быть трансформирована совместно с геном-"приманкой" плазмиды слияния GAL4 в дрожжевой штамм, который содержит ген lacZ, запускаемый промотором, который содержит последовательность активации GAL4. Кодированный кДНК белок, слитый с доменом активации транскрипции GAL4, который взаимодействует с генным-продуктом-"приманкой", восстанавливает активный белок GAL4 и, таким образом, запускает экспрессию гена HIS3. Колонии, которые экспрессируют HIS3, могут быть выявлены на основании их роста на чашках Петри, содержащих полужидкую среду на основе агар в отсутствие гистидина. кДНК может затем быть очищена из указанных штаммов и использоваться для продукции и изолирования белков, взаимодействующих с генным продуктом-"приманкой" AARS, с использованием стандартных методов, используемых в данной области техники.

Также предусмотрены тригибридные системы, которые обеспечивают детектирование взаимодействий РНК-белок в дрожжах. См., например, Hook et al., RNA. 11:227-233, 2005. Соответственно, указанные и связанные способы можно применять для идентификации клеточного партнера по связыванию полипептида AARS и для идентификации других белков или нуклеиновых кислот, которые взаимодействуют с полипептидом AARS, его клеточным партнером по связыванию, или обоими.

Конкретные варианты реализации изобретения относятся к применению метода скрининга интерактома. Конкретные примеры включают скрининг на основе белковых доменов (см., например, Voxem et al., Cell. 134:534-545, 2008; и Yu et al., Science. 322:10-110, 2008).

Как отмечено выше, изолированные партнеры по связыванию могут быть идентифицированы и, в свою очередь, можно применять вместе со стандартными методами идентификации белков или других соединений, с которыми они взаимодействуют. Конкретные варианты реализации изобретения таким образом, относятся к способам скрининга соединений, которые специфично связываются с партнером по связыванию эталонного полипептида AARS, включающим а) объединение партнера по связыванию с по меньшей мере одним исследуемым соединением в подходящих условиях и б) детектирование связывание партнера по связыванию с исследуемым соединением, с идентификацией на основании предшествующих этапов соединений, которые специфично связываются с партнером по связыванию. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения исследуемое соединение представляет собой полипептид. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения исследуемое соединение представляет собой химическое соединение, такое как низкомолекулярное соединение или пептидомиметик.

Конкретные варианты реализации изобретения включают способы скрининга для поиска соединений, которые модулируют активности эталонного полипептида AARS, включающие а) объединение полипептида с по меньшей мере одним исследуемым соединением в условиях, допускающих активность полипептида, б) осуществление оценки активности полипептида в присутствии исследуемого соединения и в) сравнение активности полипептида в присутствии исследуемого соединения с активностью полипептида в отсутствие исследуемого соединения, причем изменение активности полипептида в присутствии исследуемого соединения указывает на то, что указанное соединение модулирует активность указанного полипептида. Конкретные варианты реализации изобретения включают способы скрининга для поиска соединения, которое модулирует активность партнера по связыванию эталонного полипептида

AARS, включающие а) объединение полипептида с по меньшей мере одним исследуемым соединением в условиях, допускающих активность партнера по связыванию, б) осуществление оценки активности партнера по связыванию в присутствии исследуемого соединения и с) сравнение активности партнера по связыванию в присутствии исследуемого соединения с активностью партнера по связыванию в отсутствие исследуемого соединения, где изменение активности партнера по связыванию в присутствии исследуемого соединения указывает на то, что указанное соединение модулирует активность партнера по связыванию. Как правило, указанные и связанные варианты реализации изобретения включают оценку выбранной неканонической активности, которая связана с полипептидом AARS или его партнером по связыванию. Включены условия *in vitro* и *in vivo*, такие как условия культивирования клеток.

Конкретные варианты реализации изобретения включают способы скрининга соединения на предмет его эффективности как полного или частичного агониста эталонного полипептида AARS или его активного фрагмента или варианта, включающий а) обработку образца, содержащего полипептид, соединением и б) детектирование активности на основе агонизма в образце, как правило, путем измерения повышения неканонической активности полипептида AARS. Конкретные способы включают а) обработку образца, содержащего партнер по связыванию полипептида AARS, соединением и б) детектирование активности на основе агонизма в образце, как правило, путем измерения повышения выбранной неканонической активности полипептида AARS. Конкретные варианты реализации изобретения включают композиции, которые содержат соединение, представляющее собой агонист, идентифицированное указанным способом, и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

Также включены способы скрининга соединения на предмет его эффективности как полного или частичного антагониста эталонного полипептида AARS, включающие а) обработку образца, содержащего полипептид, соединением и б) детектирование активности на основе антагонизма в образце, как правило, путем измерения снижения в неканонической активности полипептида AARS. Конкретные способы включают а) обработку образца, содержащего партнер по связыванию полипептида AARS соединением и б) детектирование активности на основе антагонизма в образце, как правило, путем измерения снижения выбранной неканонической активности полипептида AARS. Конкретные варианты реализации изобретения включают композиции, которые содержат соединение, представляющее собой антагонист, идентифицированное указанным способом, и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения могут быть созданы системы *in vitro* для идентификации соединений, способных взаимодействовать с или модулировать эталонные последовательности AARS или его партнера по связыванию. Примеры соединений, идентифицированных с использованием указанных систем, могут применяться, например, для модуляции активности пути и для разработки самих компонентов указанного пути. Их также можно применять в скрининге на соединения, которые нарушают взаимодействия между компонентами пути; или могут непосредственно нарушать такие взаимодействия. Один типичный подход включает получение реакционной смеси полипептида AARS и исследуемого соединения в условиях и в течение времени, достаточного для возможности их взаимодействия и связывания, таким образом, с образованием комплекса, который может быть удален и/или выявлен из реакционной смеси.

Можно осуществлять скрининговые анализы *in vitro* различными путями. Например, полипептид AARS, клеточный партнер по связыванию или исследуемое соединение (соединения) могут быть заякорены на твердой фазе. Согласно указанным и связанным вариантам реализации изобретения полученные комплексы могут быть захвачены и детектироваться на твердой фазе в конце реакции. В одном примере указанного способа полипептид AARS и/или его партнер по связыванию связан с твердой поверхностью, и исследуемое соединение (соединения), которое связано с указанной поверхностью, может быть меченым, прямо или не прямо, таким образом, что его захват компонентом на твердой поверхности может быть выявлен. В других примерах, исследуемое соединение (соединения) связано с твердой поверхностью, и полипептид AARS и/или его партнер по связыванию, которые не связаны с поверхностью, являются мечеными или детектируемыми. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения для удобства, в качестве твердой фазы можно использовать титрационные микропланшеты. Заякоренный компонент (или исследуемое соединение) может быть иммобилизован путем нековалентного или ковалентного связывания. Нековалентное связывание может быть осуществлено путем простого покрытия твердой фазы раствором белка и высушивания. В альтернативном варианте иммобилизованное антитело, предпочтительно моноклональные антитела, специфичное для белка, который предполагается иммобилизовать, может использоваться для связывания белка с твердой поверхностью. Поверхности могут быть приготовлены заранее и храниться.

Для проведения типичного анализа неиммобилизованный компонент, как правило, добавляют к покрытой поверхности, содержащей связанный компонент. После завершения реакции непрореагировавшие компоненты удаляют (например, путем отмывки) в условиях, таких, что любые образовавшиеся специфические комплексы остаются иммобилизованными на твердой поверхности. Детектирование связанных комплексов на твердой поверхности можно осуществлять несколькими способами. Например, когда предварительно неиммобилизованный компонент является предварительно меченым, детектирование метки, иммобилизованной на твердой поверхности, указывает на образование комплексов.

Когда предварительно неиммобилизованный компонент не является предварительно меченным, может использоваться непрямая метка для детектирования комплексов, связанных на поверхности; например, меченное антитело, специфичное к предварительно не иммобилизованному компоненту (антитело, в свою очередь, может быть прямо или не прямо меченным с помощью меченного анти-Ig антитела).

В альтернативном варианте присутствие или отсутствие связывания исследуемого соединения можно определить, например, с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR), где изменение угла резонанса используется в качестве показателя, и где полипептид AARS или клеточный партнер по связыванию иммобилизуют на поверхности коммерчески доступного сенсорного чипа (например, изготовленного компанией BIACORE™) в соответствии со стандартным способом. Исследуемое соединение приводят в контакт с указанным чипом, и указанный сенсорный чип освещают светом конкретной длины волны под конкретным углом. Связывание исследуемого соединения также можно измерить путем детектирования пика, соответствующего исследуемому соединению, с помощью способа, согласно которому полипептид AARS или клеточный партнер по связыванию иммобилизуется на поверхности белкового чипа, адаптируемого для масс-спектрометра, исследуемое соединение приводят в контакт с указанным чипом, и способ ионизации, такой как MALDI-MC (MC с ионизацией лазерной десорбцией с использованием матрицы), ИЭР-MC, MC с бомбардировкой ускоренными атомами и т.п., используется вместе с масс-спектрометром (например, масс-спектрометром двойного фокусирования, квадрупольным масс-спектрометром, времяпролетным масс-спектрометром, масс-спектрометром преобразования Фурье, ионно-циклотронным масс-спектрометром и т.п.).

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения клеточные анализы, анализы на основе мембранных везикул или анализы на основе мембранной фракции можно применять для идентификации соединений, которые модулируют взаимодействия в нетрадиционном пути выбранного полипептида AARS. Для указанных целей можно применять клеточные линии, которые экспрессируют полипептид AARS и/или партнер по связыванию или слитый белок, содержащий домен или фрагмент указанных белков (или их комбинацию), или клеточные линии (например, клетки COS, клетки CHO, клетки HEK293, клетки HeLa и т.д.), которые были генетически трансформированы для экспрессии указанного белка (белков) или слитого белка (белков). Исследуемое соединение (соединения), которое влияет на неканоническую активность, можно идентифицировать путем наблюдения за изменением (например, статистически значимым изменением) указанной активности по сравнению с контролем или предварительно определенным уровнем.

Варианты реализации изобретения, которые относятся, например, к антисмысловым и РНК-агентам, также включают способы скрининга соединения на предмет его эффективности в изменении экспрессии эталонного полинуклеотида AARS, включающие а) обработку образца, содержащего эталонный полинуклеотид AARS соединением, таким как потенциальный антисмысловый олигонуклеотид и б) детектирование измененной экспрессии полинуклеотида AARS. В конкретных неограничивающих примерах указанные и связанные варианты реализации изобретения можно применять в клеточных анализах или в бесклеточных анализах трансляции, в соответствии со стандартными методами в данной области техники. Также включены антисмысловые и РНК-агенты, идентифицированные с помощью указанных способов.

Антитела к белковым фрагментам AARS также можно применять в скрининговых анализах, например, для идентификации агента, который специфично связывается с AARS, подтверждения специфичности или аффинности агента, который связывается с белковым фрагментом AARS, или идентификации сайта взаимодействия между агентом и белковым фрагментом AARS. Предусмотрены анализы, в которых антитело используется в качестве конкурентного ингибитора агента. Например, антитело, которое специфично связывается с белковым фрагментом AARS с известной аффинностью, может действовать в качестве конкурентного ингибитора выбранного агента и использоваться для расчета аффинности агента к белковому фрагменту AARS. Также одно или более антител, которые специфично связываются с известными эпитопами или сайтами белкового фрагмента AARS, можно применять в качестве конкурентного ингибитора для подтверждения связывания указанного агента с тем же сайтом. Другие варианты очевидны специалистам в данной области техники.

Также включены любые из указанных выше способов или другие способы скрининга, известные в данной области техники, адаптированные для высокоэффективного скрининга (HTS). HTS, как правило, используют автоматизированный скрининговый анализ библиотеки соединений-кандидатов, например, анализ, который измеряет повышение или снижение неканонической активности, описанной в настоящем изобретении.

В любом из способов скрининга, предложенных в настоящем изобретении, можно применять низкомолекулярные библиотеки или библиотеки, созданные с помощью комбинаторной химии. Библиотеки химических и/или биологических смесей, таких как грибковые, бактериальные, водорослевые экстракты, известны в данной области техники и могут подвергаться скринингу с помощью любого из способов анализа согласно изобретению. Примеры способов создания молекулярной библиотеки могут быть найдены в источниках Carell et al., 1994a; Carell et al., 1994b; Cho et al., 1993; DeWitt et al., 1993; Gallop et al.,

1994; Zuckermann et al., 1994.

Библиотеки соединений могут быть представлены в растворе (Houghten et al., 1992) или на гранулах (Lam et al., 1991), на чипах (Fodor et al., 1993), бактериях, спорах (Ladner et al., патент США № 5223409, 1993), плазмидах (Cull et al., 1992) или на фагах (Cwirla et al., 1990; Devlin et al., 1990; Felici et al., 1991; Ladner et al., патент США № 5223409, 1993; Scott и Smith, 1990). Варианты реализации настоящего изобретения включают применение различных библиотек для идентификации низкомолекулярных модуляторов одного или более белковых фрагментов AARS, их партнеров по связыванию и/или связанных с ними неканонических видов активности. Библиотеки, которые можно применять в целях изобретения включают, но не ограничиваются перечисленными: (1) химические библиотеки, (2) библиотеки природных продуктов и (3) комбинаторные библиотеки, состоящие из случайных пептидов, олигонуклеотидов и/или органических молекул.

Химические библиотеки состоят из структурных аналогов известных соединений или соединений, которые идентифицированы как "искомые" или "перспективные" посредством скрининга природных продуктов. Библиотеки природных продуктов представляют собой библиотеки, которые получены из коллекций микроорганизмов, животных, растений или морских организмов, которые используются для создания смесей для скрининга путем: (1) культивирования и экстракции жидкой среды из почвы, растений или морских микроорганизмов или (2) экстракции растений или морских организмов. Библиотеки природных продуктов включают поликетиды, не рибосомальные пептиды и их варианты (неприродные). См., например, Cane et al., *Science* 282:63-68, 1998. Комбинаторные библиотеки могут состоять из большого количества пептидов, олигонуклеотидов или органических соединений в виде смеси. Их относительно легко можно получать с помощью стандартных автоматизированных способов синтеза, ПЦР, клонирования или собственных синтетических способов.

Более конкретно, библиотека на основе комбинаторной химии представляет собой коллекцию различных химических соединений, созданных либо путем химического синтеза, либо биологического синтеза, путем объединения ряда химических "структурных элементов", таких как реагенты. Например, линейная комбинаторная химическая библиотека, такая как библиотека пептидов, образована путем объединения набора химических структурных элементов (аминокислот) каждым возможным образом для конкретной длины соединения (т.е. количества аминокислот в полипептидном соединении). Миллионы химических соединений можно синтезировать путем такого комбинаторного перемешивания химических структурных элементов.

Обзор способов комбинаторной химии и библиотек, созданных на их основе, можно найти, например, в источниках

Huc, I. and Nguyen, R. (2001) *Comb. Chem. High Throughput Screen* 4:53-74; Lepre, C A. (2001) *Drug Discov. Today* 6:133-140; Peng, S. X. (2000) *Biomed. Chromatogr.* 14:430-441; Bohm, H. J. and Stahl, M. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:283-286; Barnes, C and Balasubramanian, S. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:346-350; Lepre, Enjalbal, C, et al., (2000) *Mass Spectrom Rev.* 19:139-161; Hall, D. G., (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:262-262; Lazo, J. S., and Wipf, P. (2000) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293:705-709; Houghten, R. A., (2000) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:273-282; Kobayashi, S. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2000) 4:338-345; Kopylov, A. M. and Spiridonova, V. A. (2000) *Mol. Biol. (Mosk)* 34:1097-1113; Weber, L. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:295-302; Dolle, R. E. (2000) *J. Comb. Chem.* 2:383-433; Floyd, C D., et al., (1999) *Prog. Med. Chem.* 36:91-168; Kundu, B., et al., (1999) *Prog. Drug Res.* 53:89-156; Cabilly, S. (1999) *Mol. Biotechnol.* 12:143-148; Lowe, G. (1999) *Nat. Prod. Rep.* 16:641-651; Dolle, R. E. and Nelson, K. H. (1999) *J. Comb. Chem.* 1:235-282; Czarnick, A. W. and Keene, J. D. (1998) *Curr. Biol.* 8:R705-R707; Dolle, R. E. (1998) *Mol. Divers.* 4:233-256; Myers, P. L., (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:701-707; и Pluckthun, A. and Cortese, R. (1997) *Biol. Chem.* 378:443.

Устройства для получения комбинаторных библиотек являются коммерчески доступными (см., например, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville Ky., Symphony, Rainin, Уоберн, Массачусетс, 433A Applied Biosystems, Фостер Сити, Калифорния, 9050 Plus, Millipore, Бэдфорд, Массачусетс). Кроме того, множество самих комбинаторных библиотек является коммерчески доступным (см., например, ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Москва, Россия, Tripos, Inc., Сент-Льюис, Миссури, ChemStar, Ltd.,

Москва, Россия, 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa., Martek Biosciences, Колумбия, Мэрилэнд, и т.д.).

XII. Способы применения.

Варианты реализации настоящего изобретения включают терапевтические способы лечения. Соответственно, агенты AARS, описанные в настоящем изобретении, включая полипептиды AARS, полинуклеотиды AARS, векторы на основе полинуклеотидов AARS, экспрессирующие AARS клетки-хозяева, антисмысловые олигонуклеотиды, РНКи-агенты, а также связывающие агенты, такие как пептиды, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, пептидомиметики и другие низкомолекулярные соединения, можно применять для лечения различных неограничивающих заболеваний или состояний, связанных с неканоническими видами активности эталонной AARS. Примеры указанных неканонических видов активности включают модуляцию внеклеточной передачи сигнала, модуляцию пролиферации клеток, модуляцию миграции клеток, модуляцию дифференцировки клеток (например, гематопоза, нейрогенеза, миогенеза, остеогенеза и адипогенеза), модуляцию апоптоза или других форм клеточной гибели, модуляцию ангиогенеза, модуляцию клеточного связывания, модуляцию клеточного метаболизма, модуляцию продукции или активности цитокинов, модуляцию активности цитокиновых рецепторов, модуляцию клеточного поглощения или секреции, иммуномодуляцию, модуляцию воспаления, модуляцию метаболических процессов, таких как контроль глюкозы и т.п.

Предусмотрены терапевтические средства на основе полинуклеотидов, такие как терапевтические средства на основе антисмысловых агентов и РНКи-агентов, которые, как правило, относятся к снижению экспрессии молекулы-мишени, такой как эндогенный фрагмент AARS или клеточный партнер по связыванию полипептида AARS, который в противном случае вносит вклад в его неканоническую активность. Терапевтические средства на основе антисмысловых или РНКи-агентов, как правило, проявляют антагонизм в отношении неканонической активности, например, путем уменьшения экспрессии эталонного полипептида AARS. Также предусмотрены терапевтические средства на основе полипептидов или пептидов, антител или антигенсвязывающего фрагмента, пептидомиметиков или других малых молекул, которые проявляют агонизм или антагонизм в отношении неканонической активности эталонного полипептида AARS, например, путем взаимодействия непосредственно с полипептидом AARS, его клеточным партнером по связыванию (партнерами), или обоими.

Указанные и связанные варианты реализации изобретения включают способы применения AARS-агентов или композиций согласно настоящему изобретению для лечения клетки, ткани или субъекта. Клетки или ткани, которые можно лечить или модулировать согласно настоящему изобретению, предпочтительно представляют собой клетки или ткани млекопитающих, или более предпочтительно, клетки или ткани человека. Указанные клетки или ткани могут находиться в здоровом состоянии или в нездоровом состоянии.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, например, предложены способы модуляции терапевтически релевантных видов активности клетки, включая, но не ограничиваясь перечисленными: клеточный метаболизм, дифференцировку клеток, пролиферацию клеток, поглощение клеткой, клеточную секрецию, клеточную гибель, подвижность клетки, миграцию клеток, транскрипцию генов, трансляцию мРНК, сопротивление клетки, иммунные ответы, воспалительные ответы и т.п., включающие осуществление контакта клетки с агентом или композицией AARS, описанной в настоящем изобретении. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения клетка находится в теле субъекта. Соответственно, композиция на основе AARS может применяться для лечения по существу любой клетки, или ткани, или субъекта, у которого может быть получен благоприятный эффект от модуляции одного или более указанных видов активности.

Агенты и композиции AARS также можно применять в любом из ряда терапевтических контекстов, включая, например, случаи, связанные с лечением или предотвращением неопластических заболеваний, заболеваний или состояний иммунной системы (например, аутоиммунных заболеваний и воспалений), инфекционных заболеваний, метаболических заболеваний, нервных/неврологических заболеваний, мышечных/сердечно-сосудистых заболеваний, заболеваний, связанных с нарушением кроветворения, заболеваний, связанных с нарушением миогенеза, заболеваний, связанных с нарушением нейрогенеза, заболеваний, связанных с нарушением адипогенеза, заболеваний, связанных с нарушением остеогенеза, заболеваний, связанных с нарушением ангиогенеза, заболеваний, связанных с нарушением выживаемости клеток, заболеваний, связанных с нарушением захвата липидов, заболеваний, связанных со старением (например, потери волос, периферической или вегетативной невропатии, старческой деменции, ретинопатии) и других заболеваний.

Например, согласно конкретным иллюстративным вариантам реализации изобретения композиции, содержащие AARS, согласно изобретению можно применять для модуляции ангиогенеза, например, путем модуляции пролиферации и/или передачи сигнала клеток эндотелия. За пролиферацией и/или передачей сигнала клеток эндотелия можно наблюдать с использованием соответствующей клеточной линии (например, клеток эндотелия микрососудов легкого человека (HMVEC-L) и клеток эндотелия пупочной вены человека (HUVEC)) и с помощью соответствующего анализа (например, анализа миграции клеток эндотелия, анализа пролиферации клеток эндотелия, анализа формирования сосудов, анализа с использованием блашек матригеля и т.д.), многие из которых известны и доступны в данной области техники.

Таким образом, согласно связанным вариантам реализации изобретения композиции согласно изобретению можно применять для лечения по существу любой клетки или ткани или субъекта, который будет иметь благоприятный эффект от модуляции ангиогенеза. Например, согласно некоторым вариантам реализации изобретения клетка или ткань или субъект, подверженный или чувствительный к ангиогенезу (например, ангиогенным состояниям) может подвергаться контактированию с подходящей композицией согласно изобретению для подавления ангиогенного состояния. Согласно другим вариантам реализации изобретения клетка или ткань, подверженная или чувствительная к недостаточному ангиогенезу (например, ангиостатическому состоянию) может подвергаться контактированию с соответствующей композицией согласно изобретению для препятствования ангиостатической активности и/или обеспечения ангиогенеза.

Также включены способы модуляции гематопозеза и связанных состояний. Примеры гематопозитических процессов, которые могут модулироваться полипептидами AARS согласно изобретению, включают, но не ограничиваются перечисленными: образование миелоидных клеток (например, эритроидных клеток, тучных клеток, моноцитов/макрофагов, миелоидных дендритных клеток, гранулоцитов, таких как базофилы, нейтрофилы и эозинофилы, мегакариоцитов, тромбоцитов) и лимфоидных клеток (например, естественных киллеров, лимфоидных дендритных клеток, В-клеток и Т-клеток). Конкретные специфические гематопозитические процессы включают эритропоз, гранулоцитопоз, лимфопоз, мегакариоцитопоз, тромбоцитопоз и т.д. Также включены способы модуляции траффика или мобилизации гематопозитических клеток, включая гематопозитические стволовые клетки, клетки-предшественники, эритроциты, гранулоциты, лимфоциты, мегакариоциты и тромбоциты.

Способы модуляции гематопозеза можно осуществлять на практике *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* или в любой комбинации. Указанные способы могут осуществляться на практике на любом биологическом образце, клеточной культуре или ткани, которая содержит гематопозитические стволовые клетки, гематопозитические клетки-предшественники или другие стволовые клетки или клетки-предшественники, которые способны дифференцироваться в гематопозитическом направлении (например, произошедшие из жировой ткани стволовые клетки). Для осуществления способов *in vitro* и *ex vivo* стволовые клетки и клетки-предшественники, гематопозитического или другого происхождения, могут быть изолированы и/или идентифицированы в соответствии со способами и характеристиками, описанными в настоящем изобретении и известными в данной области техники.

Композиции согласно изобретению также могут применяться в качестве иммуномодуляторов для лечения противо-или провоспалительных симптомов путем модуляции клеток, которые опосредуют, непосредственно или опосредованно, аутоиммунные и/или воспалительные заболевания, состояния и нарушения. Применимость композиций согласно изобретению в качестве иммуномодуляторов или модуляторов воспаления можно оценивать с использованием любого из ряда известных и доступных методов в данной области техники, включая, например, анализы миграции (например, с использованием лейкоцитов или лимфоцитов) или анализы выживаемости клеток (например, с использованием В-клеток, Т-клеток, моноцитов или NK-клеток).

"Воспаление" в целом относится к биологическому ответу тканей на вредоносные стимулы, такие как патогены, повреждение клетки (например, раны) и раздражители. Термин "воспалительный ответ" относится к специфическим механизмам, посредством которых достигается и регулируется воспаление, включая, исключительно в качестве примера, активацию и миграцию клеток иммунной системы, продукцию цитокинов, расширение просвета сосудов, включая высвобождение кининов, фибринолиз и коагуляцию, среди других механизмов, описанных в настоящем изобретении и известных в данной области техники.

Клинические признаки хронического воспаления зависят от продолжительности заболевания, воспалительных повреждений, причины и анатомической области повреждения, (см., например, Kumar et al., Robbins Basic Pathology-8th Ed., 2009 Elsevier, London; Miller, LM, Pathology Lecture Notes, Atlantic Veterinary College, Charlottetown, PEI, Канада). Хронические воспаления связаны с различными патологическими состояниями или заболеваниями, включая, например, аллергии, Болезнь Альцгеймера, анемию, стеноз аортального клапана, артрит, такой как ревматоидный артрит и остеоартрит, рак, застойную сердечную недостаточность, фибромиалгию, фиброз, инфаркт миокарда, почечную недостаточность, волчанку, панкреатит, инсульт, хирургические осложнения, воспалительное заболевание легких, воспалительное заболевание кишечника, атеросклероз, неврологические нарушения, диабет, метаболические нарушения, ожирение и псориаз, среди других, описанных в настоящем изобретении и известных в данной области техники. Таким образом, композиции AARS можно применять для лечения или контроля хронического воспаления путем модуляции любого из одного или более отдельных хронических воспалительных ответов или лечения любого одного или более заболеваний или состояний, связанных с хроническим воспалением.

Критерии для оценки признаков и симптомов воспалительных и других состояний, например, для осуществления дифференциальной диагностики, а также для мониторинга лечения, например, для определения того, является ли доза, вводимая во время лечения, терапевтически эффективной, например, путем оценки улучшения в соответствии с принятыми клиническими критериями, очевидны специалистам

в данной области техники и их примеры приведены, например, в источниках

Berkow et al., eds.,
The Merck Manual, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N.J.,
1992; Goodman et al., eds., Goodman and Gilman's The
Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th edition, Pergamon
Press, Inc., Elmsford, N.Y., (2001); Avery's Drug Treatment:
Principles and Practice of Clinical Pharmacology and
Therapeutics, 3rd edition, ADIS Press, Ltd., Williams and
Wilkins, Baltimore, MD. (1987); Ebadi, Pharmacology, Little,
Brown and Co., Boston, (1985); Osolci al., eds., Remington's
Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Co.,
Easton, PA (1990); Katzung, Basic and Clinical Pharmacology,
Appleton and Lange, Norwalk, CT (1992).

Согласно другим вариантам реализации изобретения композиции, содержащие AARS, согласно изобретению можно применять для модуляции пролиферации и/или выживаемости клеток и, соответственно, для лечения или предотвращения заболеваний, нарушений или состояний, характеризующихся нарушениями пролиферации и/или выживаемости клеток. Например, согласно конкретным вариантам реализации изобретения композиции, содержащие AARS, можно применять для модуляции апоптоза и/или для лечения заболеваний или состояний, связанных с нарушением апоптоза. За процессом апоптоза можно наблюдать с помощью любого из ряда доступных методов, известных и доступных в данной области техники, включая, например, анализы, которые измеряют фрагментацию ДНК, изменения мембранной асимметрии, активацию апоптотических каспаз и/или высвобождение цитохрома С и фактора индукции апоптоза (AIF).

За прогрессом указанных и других видов и средств терапии (например, видов терапии *ex vivo*) можно с легкостью наблюдать с помощью стандартных способов и анализов и на основе критериев, известных врачам или другим специалистам в данной области техники.

XIII. Фармацевтические лекарственные формы, введение и наборы.

Варианты реализации настоящего изобретения включают полинуклеотиды AARS, полипептиды AARS, клетки-хозяева, экспрессирующие полипептиды AARS, связывающие агенты, модулирующие агенты или другие соединения, описанные в настоящем изобретении, представленные в виде фармацевтически приемлемых или физиологически-приемлемых растворов для введения в клетку или животному, отдельно или в комбинации с одним или более другими средствами терапии. Также необходимо понимать, что, при желании, композиции согласно изобретению также можно вводить в комбинации с другими агентами, такими как, например, другие белки или полипептиды или различные фармацевтически активные агенты. По существу не существует ограничений для других компонентов, которые могут быть дополнительно включены в композиции, при условии, что указанные дополнительные агенты не оказывают неблагоприятного влияния на модулирующие или другие эффекты, достижение которых является желательным.

Способы получения фармацевтически приемлемых наполнителей и носителей для растворов для фармацевтических композиций согласно изобретению хорошо известно специалистам в данной области техники, так же как и разработка подходящих режимов дозирования и схем лечения для применения конкретных композиций, описанных в настоящем изобретении, для различных способов лечения, включая, например, пероральное, парентеральное, внутривенное, интраназальное, подкожное и внутримышечное введение и получение лекарственных форм.

В конкретных приложениях, фармацевтические или терапевтические композиции согласно изобретению не стимулируют иммунную реакцию. Согласно другим вариантам реализации изобретения фармацевтические или терапевтические композиции согласно изобретению, как правило, содержащие один или более полипептидов или полинуклеотидов AARS, стимулируют иммунную реакцию, например, действуя в качестве адъюванта в вакцине или связанной композиции, или присутствуя в композиции вместе с отдельным адъювантом или агентом, стимулирующим иммунный ответ.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения AARS-агенты, такие как полипептиды AARS, полинуклеотиды AARS и антитела, имеют растворимость, которая является желательной для конкретного способа введения, такого как внутривенное введение. Примеры желательной растворимости включают растворимость, составляющую по меньшей мере примерно 1 мг/мл, по меньшей мере примерно 10 мг/мл, по меньшей мере примерно 25 мг/мл и по меньшей мере примерно 50 мг/мл.

Для конкретных способов применения фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, могут доставляться субъекту путем перорального введения. В этом случае указанные композиции могут быть представлены вместе с инертным разбавителем или с усваиваемым съедобным носителем или могут быть заключены в твердую или мягкую желатиновую капсулу или спрессованы в таблетки, или же могут быть непосредственно включены в еду пищевого рациона субъекта.

В определенных обстоятельствах желательно доставлять фармацевтические композиции, описан-

ные в настоящем изобретении, парентеральным, подкожным, внутривенным, внутримышечным, внутриартериальным, интратекальным, интрапаренхимальным, интрацистернальным, внутрижелудочковым, интрауретральным, внутригрудным, интракраниальным, интрасиновиальным или даже внутрибрюшинным путем, как описано, например, в патенте США № 5543158; патенте США № 5641515 и патенте США № 5399363 (каждый из которых полностью и конкретно включен в настоящее изобретение посредством ссылки). Подходящие устройства для парентерального введения включают устройства для инъекций с иглой (включая микроиглу), устройства для инъекций без иглы и методы инфузии.

Могут быть получены водные растворы активных соединений, представленных в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей, перемешанных подходящим образом с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Также могут быть получены дисперсии в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях и в маслах. При обычных условиях хранения и применения, указанные составы содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Фармацевтические формы, подходящие для применения путем инъекции, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для незамедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций (патент США № 5466468, полностью и конкретно включенный в настоящее изобретение посредством ссылки). Во всех случаях форма должна являться стерильной и жидкой, при условии что существует возможность ее легкого введения с помощью шприца. Указанная форма должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения и должна быть защищенной от заражения микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и/или растительные масла. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытий, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено путем использования различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимерозала и т.п. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические агенты, например, сахара или хлорид натрия. Замедленная абсорбция композиций для инъекций может осуществляться путем использования в композициях агентов, задерживающих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Для парентерального введения, например, в водном растворе, указанный раствор, при необходимости, должен быть забуферен подходящим образом, и жидкий разбавитель должен исходно являться изотоничным, что достигается с помощью достаточного количества соли или глюкозы. Указанные конкретные водные растворы являются особо подходящими для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. Стерильные водные среды, которые можно применять для указанных целей, очевидны специалистам в данной области техники в свете настоящего изобретения. Например, одна доза может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавлена к 1000 мл жидкости для подкожного введения, либо инъецирована в предполагаемое место инфузии (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, p. 1035-1038 and 1570-1580). В зависимости от состояния субъекта, подвергаемого лечению, могут требоваться некоторые вариации в размере дозы. В любом случае, соответствующая доза для конкретного субъекта определяется человеком, ответственный за введение указанной дозы. Более того, композиции для введения человеку должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты в соответствии с требованиями Отдела биологических стандартов Управления по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США, FDA.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения активных соединений в требуемом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости, с последующей стерилизацией посредством фильтрования. В целом дисперсии готовят путем включения различных стерильных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную среду для дисперсии и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше ингредиентов. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций, предпочтительные способы получения представляют собой методы вакуумной сушки и лиофилизации, которые приводят к получению порошка активного ингредиента вместе с любым дополнительным желательным ингредиентом из предварительно стерилизованного посредством фильтрования раствора.

Композиции, описанные в настоящем изобретении, могут быть представлены в нейтральной форме, или в форме соли. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислот (образованные со свободными аминокислотными группами белка), которые образуются с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислота, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и т.п. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут представлять собой соли, произошедшие из неорганических оснований, таких как, например, гидроксид натрия, калия, аммония, кальция или железа и указанных органических оснований, таких как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и т.п. После получения лекарственной формы

растворы вводят путем, который является совместимым с указанной лекарственной формой дозирования, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Лекарственные формы с легкостью вводят в различных формах дозирования, таких как растворы для инъекций, капсулы для высвобождения лекарственного средства и т.п.

В настоящем изобретении термин "носитель" включает все растворители, среды для дисперсий, наполнители, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты, буферы, несущие растворы, суспензии, коллоиды и т.п. Применение указанных сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением тех случаев, когда любая обычная среда или агент является совместимым с активным ингредиентом, предполагается его применение в терапевтической композиции. Вспомогательные активные ингредиенты также могут быть включены в композиции.

Фраза "фармацевтически приемлемый" относится к молекулярным соединениям и композициям, которые не вызывают аллергической реакции или подобной нежелательной реакции при введении человеку. Получение водной композиции, содержащей белок в качестве активного ингредиента, хорошо известно в данной области техники. Как правило, указанные композиции готовят в виде растворов для инъекций или в виде жидких растворов или суспензий; также можно получать твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидкостях до их инъектирования. Композиция также может быть эмульгированной.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения фармацевтические композиции могут доставляться с помощью интраназальных спреев, ингаляторов и/или других носителей для доставки аэрозолей. Способы непосредственной доставки в легкие композиций генов, полинуклеотидов и пептидов через назальные аэрозольные спреи описаны например, в патенте США № 5756353 и патенте США № 5804212 (каждый из которых полностью и конкретно включен в настоящее изобретение посредством ссылки). Подобным образом, доставка лекарственных средств с использованием микрочастиц смолы для интраназального введения (Takenaga et al., 1998) и лизофосфатидилглицериновых соединений (патент США № 5725871, полностью и конкретно включенный в настоящее изобретение посредством ссылки) также хорошо известны в области фармацевтики. Подобным образом, доставка лекарственного средства через слизистые оболочки в форме матрицы на основе политетрафторэтилена описана в патенте США № 5780045 (полностью и конкретно включенном в настоящее изобретение посредством ссылки).

Фармацевтические композиции могут быть представлены в виде композиций с быстрым и/или замедленным высвобождением. Композиции с замедленным высвобождением включают композиции с отсроченным, модифицированным, импульсным, контролируемым, направленным и программируемым высвобождением. Таким образом, композиции могут быть представлены в виде суспензии или твердого вещества, полужидкого вещества или тиксотропной жидкости для введения в виде имплантируемого депо, обеспечивающего замедленное высвобождение полинуклеотидов AARS, полипептидов AARS, связывающих агентов, модулирующих агентов и других активных агентов. Примеры указанных лекарственных форм включают, но не ограничиваются перечисленными: покрытые лекарственным средством стены и полужидкости и суспензии, содержащие ламеллярные везикулы или микрочастицы на основе поли(DL-молочной-ко-глицеролевой)кислоты (PGLA), поли(DL-лактид-ко-глицерида) (PLG) или поли(лактида) (PLA) с нагрузкой лекарственного средства, гидрогели (Hoffman AS: Алл. N.Y. Acad. Sci. 944: 62-73 (2001)), системы полиаминокислотных наночастиц, которые продаются под торговой маркой MEDUSA®, разработанной компанией Flamel Technologies Inc., неводные гелевые системы, которые продаются под торговой маркой ATRIGEL®, разработанной компанией Atrix, Inc., и лекарственные формы на основе изобутирата ацетата сахарозы пролонгированного действия, которые продаются под торговой маркой SABER®, разработанной компанией Durect Corporation, и системы на основе липидов, разработанные компанией SkyePharma и которые продаются под торговой маркой DEPOFOAM®.

Устройства для замедленного высвобождения, способные доставлять желаемые дозы фармацевтических композиций в течение длительных периодов времени, известны в данной области техники. Например, в патентах США № 5034229; 5557318; 5110596; 5728396; 5985305; 6113938; 6156331; 6375978 и 6395292; описаны устройства на основе осмотического давления, способные доставлять лекарственную форму активного агента, такую как раствор или суспензия, с желаемой скоростью в течение длительного периода времени (т.е. периода, варьирующего от более чем одной недели вплоть до одного года или более). Другие типичные устройства замедленного высвобождения включают насосы регулируемого типа, которые обеспечивают постоянный ток, регулируемый ток или программируемый ток лекарственной формы благоприятного агента, которые доступны из компании Medtronic, включая интратекальные насосы, которые продаются под торговой маркой SYNCHROMED INFUSION SYSTEM®, системы Johnson and Johnson, которые продаются под торговыми марками CODMAN® division pumps и INSET® technologies pumps. Дополнительные примеры устройств описаны в патентах США № 6283949; 5976109; 5836935 и 5511355.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения доставка может осуществляться с использованием липосом, нанокapsул, микрочастиц, микросфер, липидных частиц, везикул и т.п. для вве-

дения композиций согласно настоящему изобретению в подходящие клетки-хозяева. В частности, композиции согласно настоящему изобретению могут быть представлены в инкапсулированной форме для доставки в виде липидных частиц, липосом, везикул, наносфер, наночастиц и т.п. Получение и применение указанных везикул для доставки можно осуществлять с использованием известных и стандартных методов.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения агенты, предложенные в настоящем изобретении, могут быть присоединены к фармацевтически приемлемому твердому субстрату, включая биосовместимые и биodeградируемые субстраты, такие как полимеры и матрицы. Примеры указанных твердых субстратов включают, но не ограничиваются перечисленными: полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(винилспирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, не деградируемый этиленвинилацетат, деградируемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как поли(молочная-ко-гликолевая кислота) (PLGA) и LUPRON DEPOT™ (микросферы для инъекций, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и лейпролида ацетата), поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту, коллаген, металл, гидроксипатит, биостекло, алюминат, биокерамические материалы и очищенные белки.

Согласно одному конкретному варианту реализации изобретения твердый субстрат содержит биodeградируемые полимеры, продающиеся под торговой маркой ATRIGEL™ (QLT, Inc., Ванкувер, Канада). Система доставки лекарственных средств ATRIGEL® состоит из биodeградируемых полимеров, растворенных в биосовместимых носителях. Фармацевтические препараты могут быть помещенными в указанную жидкую систему доставки во время изготовления или, в зависимости от продукта, могут позже добавляться врачом во время применения. Когда жидкий продукт инъецируют в подкожное пространство через малокалиберную иглу или помещают в доступные области ткани с помощью канюли, вода в тканевых жидкостях вызывает преципитацию полимера и фиксацию лекарственного средства в твердом импланте. Лекарственное средство, инкапсулированное в имплант, затем высвобождается контролируемым образом по мере того, как полимерная матрица со временем биodeградирует.

Фармацевтические композиции для применения согласно настоящему изобретению также можно вводить местным, (внутри)кожным или трансдермальным путем на кожу или слизистые. Типичные лекарственные формы для указанной цели включают гели, гидрогели, лосьоны, растворы, крема, мази, присыпки, бинты, пены, пленки, кожные пластыри, брикеты, импланты, губки, волокна, повязки и микроэмульсии. Также можно применять липосомы. Типичные носители включают спирт, воду, минеральное масло, жидкий вазелин, белый вазелин, глицерин, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль. Могут быть включены усилители проникновения, см., например, Finnin and Morgan: J. Pharm. Sci. 88(10): 955-958, (1999). Другие пути местного введения включают доставку путем электропорации, ионтофореза, фонофореза, сонофореза и инъекции через микроиглу или без иглы, например, с использованием систем, продаваемых под торговыми марками POWDERJECT™ и BIOJECT™.

Способы получения лекарственных форм хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в источнике Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 20th edition, ISBN: 0683306472 (2000). Композиции и агенты, предложенные в настоящем изобретении, могут вводиться в соответствии со способами настоящего изобретения в соответствии с терапевтически эффективным режимом дозирования. Количество и частота введения дозы выбираются для достижения эффективного уровня агента при отсутствии неблагоприятного эффекта. Эффективное количество соединения согласно настоящему изобретению зависит от пути введения, типа теплокровного животного, подвергаемого лечению, и физических характеристик конкретного рассматриваемого теплокровного животного. Указанные факторы и их соотношение для определения указанного количества, хорошо известны квалифицированными практиками в области медицины. Указанное количество и способ введения могут быть оптимизированы для достижения оптимальной эффективности, но зависят от таких факторов, как масса тела, диета, сопутствующее лечение и другие факторы, которые очевидны специалистам в области медицины.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения количество вводимой композиции или агента в целом варьирует от примерно 0,1 до примерно 100 мг/кг/день и, как правило, от примерно 0,1 до 10 мг/кг, при пероральном или внутривенном введении. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения доза составляет 5 или 7,5 мг/кг. Согласно различным вариантам реализации изобретения доза составляет примерно 50-2500 мг в день, 100-2500 мг/день, 300-1800 мг/день или 500-1800 мг/день. Согласно одному варианту реализации изобретения доза лежит в пределах между примерно 100 и 600 мг/день. Согласно другому варианту реализации изобретения доза лежит в пределах между примерно 300 и 1200 мг/день. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения композицию или агент вводят в дозе 100, 240, 300, 600, 1000, 1200 или 1800 мг/день, в одной или более доз в день (т.е. когда комбинированные дозы достигают желательной суточной дозы). Согласно связанным вариантам реализации изобретения доза составляет 100 мг два раза в день, 150 мг два раза в день, 240 мг два раза в день, 300 мг два раза в день, 500 мг два раза в день или 600 мг два раза в день. Согласно различным вариантам реализации изобретения композицию или агент вводят в виде одной или нескольких доз. Исходная доза

и последующие дозы могут быть одинаковыми или разными.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения композицию или агент вводят в одной дозе, составляющей от 0,1 до 10 мг/кг или от 0,5 до 5 мг/кг. Согласно другим вариантам реализации изобретения композицию или агент вводят в дозе от 0,1 до 50 мг/кг/день, от 0,5 до 20 мг/кг/день или от 5 до 20 мг/кг/день.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения композицию или агент вводят перорально или внутривенно, например, путем инфузии в течение периода времени, составляющего, например, примерно от 10 до 90 мин. Согласно другим связанным вариантам реализации изобретения композицию или агент вводят путем непрерывной инфузии, например, в дозе между от примерно 0,1 до примерно 10 мг/кг/ч в течение периода времени. Несмотря на то что период времени может варьировать, согласно конкретным вариантам реализации изобретения период времени может составлять между примерно 10 мин и примерно 24 ч или между примерно 10 мин и примерно тремя днями.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения эффективное количество или терапевтически эффективное количество представляет собой количество, достаточное для достижения общей концентрации композиции или агента в плазме крови субъекта при C_{\max} , лежащей в пределах между примерно 0,1 мкг/мл и примерно 20 мкг/мл или между примерно 0,3 мкг/мл и примерно 20 мкг/мл. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения пероральная доза представляет собой количество, достаточное для достижения концентрации в плазме крови (C_{\max}) между примерно 0,1 мкг/мл и примерно 5 мкг/мл или между примерно 0,3 мкг/мл и примерно 3 мкг/мл. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения внутривенная доза представляет собой количество, достаточное для достижения концентрации в плазме крови (C_{\max}) между примерно 1 мкг/мл и примерно 10 мкг/мл или между примерно 2 и примерно 6 мкг/мл. Согласно связанным вариантам реализации изобретения общая концентрация агента в плазме крови субъекта соответствует средней минимальной концентрации меньше примерно 20 мкг/мл и/или концентрации в равновесном состоянии меньше примерно 20 мкг/мл. Согласно другому варианту реализации изобретения общая концентрация агента в плазме крови субъекта соответствует средней минимальной концентрации менее примерно 10 мкг/мл и/или концентрации в равновесном состоянии меньше примерно 10 мкг/мл.

Согласно другому варианту реализации изобретения общая концентрация агента в плазме крови субъекта соответствует средней минимальной концентрации в диапазоне между примерно 1 нг/мл и примерно 10 мкг/мл и/или концентрации в равновесном состоянии между примерно 1 нг/мл и примерно 10 мкг/мл. Согласно одному варианту реализации изобретения общая концентрация агента в плазме крови субъекта соответствует средней минимальной концентрации в диапазоне между примерно 0,3 мкг/мл и примерно 3 мкг/мл и/или концентрации в равновесном состоянии между примерно 0,3 мкг/мл и примерно 3 мкг/мл.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения композицию или агент вводят в количестве, достаточном для достижения у млекопитающего концентрации в плазме крови, соответствующей средней минимальной концентрации в диапазоне между примерно 1 нг/мл и примерно 10 мкг/мл, и/или концентрации в равновесном состоянии между примерно 1 нг/мл и примерно 10 мкг/мл. Согласно связанным вариантам реализации изобретения общая концентрация агента в плазме крови млекопитающего соответствует средней минимальной концентрации в диапазоне между примерно 0,3 мкг/мл и примерно 3 мкг/мл и/или концентрации в равновесном состоянии между примерно 0,3 мкг/мл и примерно 3 мкг/мл.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, эффективное количество композиции или агента или концентрация в плазме крови указанной композиции или агента достигается или поддерживается, например, в течение по меньшей мере 15 мин, по меньшей мере 30 мин, по меньшей мере 45 мин, по меньшей мере 60 мин, по меньшей мере 90 мин, по меньшей мере 2 ч, по меньшей мере 3 ч, по меньшей мере 4 ч, по меньшей мере 8 ч, по меньшей мере 12 ч, по меньшей мере 24 ч, по меньшей мере 48 ч, по меньшей мере 3 дней, по меньшей мере 4 дней, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере одной недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере одного месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере одного года, по меньшей мере 2 лет или более чем 2 лет.

Согласно конкретным основанным на полипептидах вариантам реализации изобретения количество вводимого полипептида, как правило, лежит в диапазоне от примерно 0,1 мкг/кг до примерно 0,1 мг/кг до примерно 50 мг/кг массы тела пациента. В зависимости от типа и тяжести заболевания, примерно 0,1 мкг/кг до примерно 0,1 мг/кг до примерно 50 мг/кг массы тела (например, примерно 0,1-15 мг/кг/доза) полипептида может являться начальной предполагаемой дозой для введения пациенту, как путем, например, одного или более отдельных введений, так и путем непрерывной инфузии. Например, режим дозирования может включать введение начальной нагрузочной дозы, составляющей примерно 4 мг/кг, с последующим поддержанием в течение недели дозы, составляющей примерно 2 мг/кг полипептида, или примерно половины нагрузочной дозы. Однако можно применять другие режимы дозирования. Типичная суточная доза может варьировать от примерно 0,1 мкг/кг до примерно от 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от факторов, перечисленных выше. В случае повторных введений в течение нескольких дней или более в зависимости от состояния, лечение продолжают до достижения желаемого

подавления симптомов заболевания.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения в плазме крови достигается уровень эффективной дозы или средняя минимальная концентрация композиции или агента, описанного в настоящем изобретении. Указанный уровень с легкостью можно определить с использованием стандартных методов.

Согласно другим аспектам вариантов реализации настоящего изобретения, предложены наборы, содержащие один или более контейнеров, наполненных одним или более из полипептидов, полинуклеотидов, антител, многокомпонентных комплексов, их композиций, и т.д., согласно изобретению, как описано в настоящем изобретении. Наборы могут включать письменные инструкции по применению указанных композиций (например, для модуляции клеточной передачи сигнала, ангиогенеза, рака, воспалительных состояний, диагностирования и т.д.).

Наборы в настоящем изобретении также могут содержать один или более дополнительных терапевтических агентов или других компонентов, подходящих или желательных для подвергнутого лечению симптома или для желаемого диагностического применения. Дополнительный терапевтический агент может при желании содержаться во втором контейнере. Примеры дополнительных терапевтических агентов включают, но не ограничиваются перечисленными: антинеопластические агенты, противовоспалительные агенты, антибактериальные агенты, противовирусные агенты, ангиогенные агенты, и т.д.

Наборы в настоящем изобретении могут также включать один или более шприцов или других компонентов, необходимых или желательных для облегчения предполагаемого способа доставки (например, стентов, имплантируемых депо, и т.д.).

Все публикации, патентные заявки и выданные патенты, цитированные в настоящем изобретении, включены в настоящее изобретение посредством ссылки, как если бы было конкретно указано, что каждая указанная публикация, патентная заявка или выданный патент отдельно включена посредством ссылки.

Хотя раскрытое выше изобретение для его лучшего понимания было описано довольно подробно с помощью иллюстраций и примеров, специалистам в данной области техники очевидно, что в свете идеи настоящего изобретения возможны конкретные изменения и модификации в пределах сущности и объема прилагаемой формулы изобретения. Следующие примеры приведены исключительно в качестве иллюстрации и не ограничивают настоящее изобретение. Специалисты в данной области техники с легкостью определяют различные не критичные параметры, которые могут быть изменены или модифицированы для получения по существу таких же результатов.

XIV. Примеры.

Общие методы, если иное не указано в приведенных ниже примерах, следующие общие методы оптимизации генов, низкопроизводительной или более масштабной экспрессии белков, очистки белков, анализа транскрипционной активности и скрининга использовали для создания и описания полипептидов AARS, описанных в приведенных ниже примерах.

Синтез генов и клонирование в векторах экспрессии

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие содержащие эпитопные метки варианты полипептидов AARS, были кодон-оптимизированы и клонированы в бактериальных векторах экспрессии с использованием способов, перечисленных ниже.

Согласно способу (1), кодон-оптимизированную ДНК E.coli (Welch et al., PLoS ONE 4(9): e7007 doi:10.1371/journal.pone.0007002), кодирующую каждый полипептид AARS, синтезировали с помощью ДНК 2,0 (Менло-Парк, CA) и синтезировали два варианта каждого полипептида AARS, содержащие N-концевую или C-концевую комбинированную эпитопную метку, содержащую как гистидиновый маркер, так и эпитопную метку V5.

ДНК, кодирующая меченные по N-концу полипептиды AARS, синтезировали с 5' удлинением, кодирующим в направлении 5'-3' сайт связывания рибосом (rbs (подчеркнутый ниже)), сайт рестрикции NdeI, метку, содержащую шесть гистидинов, и эпитопную метку V5, (AGGAGGTAAACATATGCATCATCATCATCACGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTTTGCTCGGTCTCGATTCTACG) (SEQ ID NO: 1), который слит в рамке с предсказанной открытой рамкой считывания полипептида AARS. В случаях, когда полипептид AARS содержит предсказанный нативный иницирующий остаток метионина (ATG) или первый аминокислотный остаток предсказанного полипептида AARS представляет собой Met, указанный остаток удаляли. На конец предсказанной открытой рамки считывания полипептида AARS добавляли два стоп-кодона и сайт XhoI (TAATGACTCGAG) (SEQ ID NO: 2). ДНК, кодирующую меченные по C-концу полипептиды AARS, синтезировали с 5'-удлинением, кодирующим rbs (подчеркнутый ниже) и сайт рестрикции NdeI, который либо повторяет предсказанный нативный старт-кодон для полипептида AARS, либо встраивает ATG в рамке с открытой рамкой считывания предсказанного полипептида AARS, (AGGAGATAAAACATATG) (SEQ ID NO: 3).

Согласно различным вариантам реализации изобретения сайт связывания рибосом может содержать последовательности 5) или GAAGGAGATATACAT (SEQ ID NO: 6).

На 3'-конце открытой рамки считывания предсказанного полипептида AARS синтезировали 3'-

удлинение, кодирующее в направлении 5'-3' эпитопную метку V5, маркер, содержащий шесть гистидинов, два стоп-кодона и сайт XhoI, (GGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCACCACCATCATCACCATTAAATGACTCGAG) (SEQ ID NO: 7), который слит в рамке с предсказанной открытой рамкой считывания полипептида AARS. Если полипептид AARS включал предсказанный нативный стоп-кодон, указанный кодон удаляли.

Синтезированные последовательности ДНК, кодирующие полипептиды AARS, субклонировали в векторе pJExpress411 (ДНК 2,0). После секвенирования для подтверждения синтеза правильного продукта, векторы экспрессии трансформировали в бактерии для экспрессии белка, как описано более подробно ниже.

В способе (2), кодон-оптимизированную ДНК E.coli (Ermolaeva MD (2001) Curr. Iss. Mol. Biol. 3(4)91-7), кодирующую каждый полипептид AARS, синтезировали с помощью GENEWIZ (Саус-Плейнфилд, Нью Джерси). Каждую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид AARS, синтезировали с короткими 5'- и 3'-удлинениями, содержащими уникальные сайты рестрикции для последующего клонирования.

В частности, на 5'-конце предсказанной открытой рамки считывания встраивали сайт рестрикции BamHI. В случаях, когда полипептид AARS содержал предсказанный нативный иницирующий остаток метионина (ATG) или первый аминокислотный остаток предсказанного полипептида AARS представлял собой Met, указанный остаток удаляли. Кроме того, на 3' конце предсказанной открытой рамки считывания встраивали сайт рестрикции XhoI. В случаях, когда полипептид AARS содержал предсказанный нативный стоп-кодон, указанный стоп-кодон удаляли.

После расщепления рестриктазами полученные последовательности ДНК субклонировали в модифицированных векторах pET-24b (EMD, Gibbstown, NJ), содержащих либо N-концевую (pET24b_N-6XHis/V5), либо C-концевую (pET24b_C-V5/6xHis) комбинированную эпитопную метку, содержащую как шесть гистидинов, так и эпитопную метку V5 (вектор, модифицированный с помощью GENEWIZ, (Саус-Плейнфилд, Нью Джерси)).

После расщепления рестриктазами и клонирования ДНК, кодирующую N-меченный полипептид AARS, клонировали в N-меченном векторе (pET24b N-6xHis/V5), который содержит 5' последовательность ДНК, кодирующую шесть гистидинов и эпитопную метку V5, (CATATGCATCATCATCATCATCACGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCCTCGGTCTCGATTCTACGGGATCC) (SEQ ID NO: 8), в рамке с иницирующим кодоном (ATG), встроенным в сайт рестрикции NdeI. Указанное 5'-удлинение слито с открытой рамкой считывания предсказанного полипептида AARS с помощью короткого линкера, состоящего из 2 аминокислот, (GS).

На 3'-конце предсказанной открытой рамки считывания ДНК, кодирующая N-меченный полипептид AARS, содержит последовательность ДНК, кодирующую участок из 2 аминокислот (LE), за которым следуют два терминирующих кодона (CTCGAGTAATGA) (SEQ ID NO: 9).

После рестрикционного расщепления и клонирования ДНК, кодирующую C-меченный полипептид AARS, клонировали в C-меченном векторе (pET24b C-V5/6xHis), содержащем 5' последовательность, кодирующую иницирующий кодон (ATG), встроенный в сайт рестрикции NdeI, который слит с открытой рамкой считывания предсказанного полипептида AARS с помощью короткого линкера, состоящего из 2 аминокислот, (GS), (CATATGGGATCC) (SEQ ID NO: 10).

На 3'-конце предсказанной открытой рамки считывания кодирующая C-меченный полипептид AARS ДНК содержит 3'-последовательность ДНК, кодирующую короткий линкер, состоящий из 2 аминокислот (LE), за которым следует эпитопная метка V5, за которой следуют шесть гистидинов и два стоп-кодона,

CTCGAGGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCACCACC ACCACCACCACTAATGA (SEQ ID NO: 11).

Экспрессия, очистка и биофизические характеристики полипептида AARS.

6xHis-меченные полипептиды AARS экспрессируют в бактериях в среднепроизводительном формате и/или в культуре большого масштаба во флаконах в зависимости от требуемого количества белка. Полипептиды AARS очищают с помощью аффинной и ионообменной хроматографии, как описано ниже и как специально указано для конкретных экспериментов.

Бактериальные культуры: 100 нг вектора экспрессии, содержащего кодон-оптимизированную ДНК, кодирующую каждый полипептид AARS (как описано выше), трансформировали в компетентные клетки бактерии E.coli BL21(DE3) (EMD chemicals, кат. № 69450) при 42°C в течение 30 с в планшетах для ПЦР. Также оценивали штаммы C41(DE3) (Lucigen, кат. № 60442), HMS174(DE3) (EMD chemicals, кат. № 69453) и Origami2(DE3) (EMD chemicals, кат. № 71345). Планшеты помещали на лед на 2 мин и добавляли 100 мкл среды SOC, с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37°C. В каждую лунку 24-луночного термоблока (Qiagen, кат. № 19583) добавляли 5 мл автоиндукционной среды (EMD chemicals, кат. № 71491) с добавлением канамицина (100 мкг/мл). Реагенты для трансформации добавляли в отдельные лунки, термоблок запечатывали с помощью клейкой пленки (VWR, кат. по 60941-078) и инкубировали в течение ночи при 250 об/мин на шейкере при 37°C. При использовании низкотемпературных условий (25°C) инкубацию осуществляли в течение 48 ч.

Для более масштабной экспрессии, 200 мл автоиндукционной среды с добавлением канамицина (100 мкг/мл) добавляли во флаконы на 500 мл Erlenmeyer с вентиляционными крышками (Corning, № по каталогу 431401). Реагенты для трансформации добавляли в отдельные флаконы и инкубировали в течение 30 ч при 250 об/мин на шейкере при 37°C. Для объема 1 л, использовали среду TB (BD Biosciences, кат. № 243820) вместо автоиндукционной среды и инициировали 4-часовую индукцию (0,5 mM IPTG) при достижении культурой 0,6-1 OD₆₀₀.

Изолирование белка. После того, как культура достигала стационарной фазы (как правило, OD₆₀₀ 3-6), термоблоки центрифугировали при 3600×g в течение 10 мин. Среду осторожно отбирали и термоблоки замораживали при -80°C или -20°C в течение 10 мин. Затем указанным термоблокам позволяли оттаивать при комнатной температуре и в каждую лунку добавляли 1 мл лизирующего буфера (100 мл Bug-buster, с добавлением 200 мкл лизоназы (EMD chemicals, кат. по 71370) и полную смесь ингибиторов протеаз без ЭДТА "complete mini EDTA-free" (Roche, кат. № 11836170001)). Осадки ресуспендировали путем многократного пипетирования до тех пор, пока не оставалось видимых агрегатов, и переносили в пробирки Эппендорфа, с последующей инкубацией в течение 10-20 мин на шейкере при комнатной температуре. После центрифугирования при 16000 g в течение 10 мин при 4°C, лизаты наносили на 96-луночный планшет TurboFilter 96, включенный в набор Ni-NTA Superflow 96 BioRobot (Qiagen, кат. № 969261), и центрифугировали при 500 g в течение 5-10 мин.

Для более масштабной экспрессии, культуру в фазе стационарного роста переносили в колбы на 500 мл и центрифугировали при 6000 g в течение 10 мин. Среду сливали и осадок хранили при -80°C или -20°C до дальнейшей обработки. Затем осадку позволяли оттаивать при комнатной температуре и в каждую колбу добавляли 20 мл лизирующего буфера. Осадки ресуспендировали путем многократного пипетирования до тех пор, пока не оставалось видимых агрегатов, с последующей инкубацией в течение 20 мин на шейкере при комнатной температуре. После центрифугирования при 10000 g в течение 30 мин при 4°C, лизаты переносили в чистые пробирки или колбы. Если следовые количества обломков клеток оставались после переноса, образец центрифугировали повторно или пропускали через целлюлозно-ацетатную мембрану, 0,45 мкм (Corning, кат. № 430314), для дополнительной очистки. Для объема 1 л, использовали микрофлюидизацию при 14000 фунтов/кв. дюйм (Microfluidics, кат. № 110L) вместо лизирующего буфера.

Аффинная очистка: 96-луночный планшет QIAFilter покрывали 200 мкл суспензии Ni-NTA Superflow, включенной в набор Ni-NTA Superflow 96 BioRobot и ионообменную смолу уравнивали путем добавления 600 мкл связывающего буфера (20 mM фосфат натрия, 500 mM хлорид натрия и 10 mM имидазол, pH 7,5). Вакуумировали (-15 дюймов рт. ст.) до тех пор, пока весь буфер не проходил через смолу. Очищенные клеточные лизаты из предварительного этапа затем наносили на 96-луночный планшет QIAFilter® и позволяли связываться в течение 5 мин. Вакуумировали (-3 дюймов рт. ст.) в течение приблизительно 5 мин до тех пор, пока все образцы не проходили через смолу. Указанную смолу затем промывали 1 мл связывающего буфера с последующими двумя промывками 1 мл связывающего буфера, содержащего 0,1% Тритон X-100. Смолу затем промывали 10 раз 1 мл связывающего буфера без Тритона X-100. Связанные 6xHis-меченные полипептиды AARS вымывали 450 мкл элюирующего буфера (20 mM фосфат натрия, 500 mM хлорид натрия и 500 mM имидазол, pH 7,5) и хранили при 4°C.

Для более масштабной экспрессии, на пустую одноканальную колонку "Poly-Prep" (Bio-Rad, кат. № 731-1550) наносили 1 мл суспензии Ni-NTA Superflow (Qiagen, кат. № 30450) и 0,5 мл ионообменной смолы уравнивали путем добавления 5 мл связывающего буфера. Затем на колонку наносили очищенный клеточный лизат с предыдущего этапа и пропускали под действием силы тяжести. Смолу сначала промывали 50 мл связывающего буфера вместе с 0,1% Тритоном X-100, затем промывали 50 мл связывающего буфера без Тритона X-100. Связавшиеся 6xHis-меченные полипептиды AARS вымывали с помощью 2 мл элюирующего буфера и хранили при 4°C.

Этапы обессоливания и доочистки: Для полипептидов AARS с молекулярной массой >10 кДа, мембрану Omega 10K 96-луночного фильтрационного планшета AcroPrep (Pall, кат. № 5034) промывали 20 мкл 1X ФСБ и планшет помещали на вакуумный коллектор (>10 дюймов рт. ст.) до полного прохождения жидкости. Элюаты из предыдущего этапа (Ni-NTA) распределяли в каждую лунку и вакуумировали до полного прохождения жидкости. Указанные этапы повторяли до тех пор, пока весь объем элюата (450 мкл) не был обработан. Полипептиды AARS восстанавливали путем добавления в каждую лунку 180 мкл 1X ФСБ, pH 7,4, осторожно пипетируя 10 раз, и затем переносили в чистый термоблок. Указанный этап повторяли для получения общего объема 360 мкл на лунку и термоблок хранили при 4°C. Для полипептидов AARS с молекулярной массой <10 кДа, элюаты из Ni-NTA наносили на центрифужный фильтр Amicon Ultra-15 с мембраной Ultracel-3 (Millipore, кат. № UFC900308), с последующим добавлением 10 мл 1X ФСБ и центрифугированием при 3600 g в течение 10-30 мин до получения объема менее чем 360 мкл. Образцы восстанавливали и добавляли 1X ФСБ с получением конечного объема 360 мкл.

Для удаления эндотоксинов фильтровальный планшет AcroPrep Advance с мембраной Mustang Q (Pall, кат. № 8171) промывали 300 мкл 1X ФСБ и центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин для удаления буфера. В указанный фильтровальный планшет добавляли обессоленные полипептиды AARS (360

мкл/лунку) и инкубировали на шейкере в течение 5-10 мин. Планшет затем центрифугировали при 1000 g в течение 5-10 мин и прошедшие через фильтр фракции, содержащие полипептиды AARS, собирали и хранили при 4°C.

Для более масштабной экспрессии элюаты из Ni-NTA наносили на центрифужный фильтр Amicon Ultra-15 с мембраной Ultracel-3 или Ultracel-10 (Millipore, кат. № UFC900308 или UFC901008), в зависимости от молекулярной массы полипептида AARS, и затем центрифугировали при 3600 g в течение 10-30 мин до уменьшения объема до 250 мкл. Образцы перемешивали в 10 мл 1X ФСБ, pH 7,4, и снова центрифугировали при 3600 g в течение 10-30 мин до получения объема примерно 250 мкл. Указанный этап повторяли еще один раз, супернатанты восстанавливали и добавляли 1X ФСБ до получения конечного объема 1,5 мл. Для объема 1 л, элюат Ni-NTA диализовали против 1X ФСБ в течение ночи вместо использования фильтрования.

Для удаления эндотоксинов сильную анионообменную мембрану Sartobind Q 5 (Sartorius, кат. № Q5F) промывали 1 мл 1X ФСБ и через указанную мембрану медленно пропускали полипептиды AARS с использованием пластикового шприца. Прошедшую через мембрану фракцию, содержащую полипептиды AARS, собирали в 96-луночный термоблок с глубокими лунками, который запечатывали и хранили при 4°C.

6xHis-меченные полипептиды AARS, экспрессируемые в бактериях и обнаруженные в тельцах включения, очищали с использованием аффинной хроматографии и ряда этапов повторной укладки, как описано ниже.

Бактериальные культуры: 100 нг плазмид, кодирующих каждый полипептид AARS, трансформировали в компетентные клетки бактерии E.coli BL21(DE3) (EMD chemicals, кат. № 69450) или C41(DE3) (Lucigen, кат. № 60442) при 42°C в течение 30 с в ПЦР-планшетах. Указанные планшеты помещали на лед на 2 мин и добавляли 100 мкл среды SOC с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37°C. В каждую лунку 24-луночного термоблока (Qiagen, кат. № 19583) добавляли 5 мл автоиндукционной среды (EMD chemicals, кат. № 71491) с добавлением канамицина (100 мкг/мл). В отдельные лунки добавляли реагенты для трансформации, термоблок запечатывали с помощью клейкой пленки (VWR, кат. по 60941-078) и инкубировали в течение ночи при 250 об/мин на шейкере при 37°C.

Для более масштабной экспрессии, добавляли 200 мл автоиндукционной среды с добавлением канамицина (100 мкг/мл) во флаконы Erlenmeyer на 500 мл с вентиляционными крышками (Corning, кат. № 431401). Реагенты для трансформации добавляли в отдельные флаконы и инкубировали в течение 30 ч при 250 об/мин на шейкере при 37°C. Для объема 1 л, использовали среду TB (BD Biosciences, кат. № 243820) вместо автоиндукционной среды и инициировали 4-часовую индукцию (0,5 mM IPTG), при достижении культурой 0,6-1 OD₆₀₀.

Изолирование: после достижения культурами фазы стационарного роста (как правило, OD₆₀₀ 3-6), термоблоки центрифугировали при 3600×g в течение 10 мин. Среду осторожно отбирали и термоблоки замораживали при -80°C или -20°C в течение 10 мин. Затем указанным термоблокам позволяли оттаивать при комнатной температуре и в каждую лунку добавляли 1 мл лизирующего буфера (100 мл Bugbuster, с добавлением 200 мкл лизолазы (EMD chemicals, кат. по 71370) и полную смесь ингибиторов протеаз без ЭДТА "complete mini EDTA-free" (Roche, кат. № 11836170001)). Осадки ресуспендировали путем многократного пипетирования до тех пор, пока не оставалось видимых агрегатов, и переносили в пробирки Эппендорфа, с последующей инкубацией в течение 10-20 на шейкере при комнатной температуре. После центрифугирования при 16000×g в течение 10 мин при 4°C, растворимые лизаты удаляли и тельца включения тщательно ресуспендировали в денатурирующем связывающем буфере (20 mM фосфат натрия, 500 mM хлорид натрия, 6 M гидрохлорид гуанидина, 10 mM имидазол, pH 7,5). Образцы центрифугировали при 16000 g в течение 10 мин и супернатанты наносили на 96-луночный планшет TurboFilter, включенный в набор Ni-NTA Superflow 96 BioRobot (Qiagen, кат. № 969261), с последующим центрифугированием при 500 g в течение 5-10 мин. Фильтраты собирали в чистый 96-луночный термоблок (Greiner, кат. № 780286).

Для более масштабной экспрессии культуру в фазе стационарного роста переносили в колбы на 500 мл и центрифугировали при 6000 g в течение 10 мин. Среду сливали и осадок хранили при -80°C или -20°C до дальнейшей обработки. Затем осадку позволяли оттаивать при комнатной температуре и в каждую колбу добавляли 20 мл лизирующего буфера. Осадки ресуспендировали путем многократного пипетирования до тех пор, пока не оставалось видимых агрегатов, с последующей инкубацией в течение 20 мин на шейкере при комнатной температуре. После центрифугирования при 10000 g в течение 30 мин при 4°C растворимые лизаты удаляли и нерастворимые тельца включения тщательно ресуспендировали в денатурирующем связывающем буфере. Для объема 1 л, использовали микрофлюидизацию при 14000 фунтов/кв. дюйм (Microfluidics, кат. № 110L) вместо использования лизирующего буфера. После ресуспендирования телец включения проводили этап центрифугирования при 10000 g в течение 30 мин с последующим фильтрованием через 0,45 мкм мембрану PES (VWR, са. № 87006).

Аффинная очистка. На 96-луночный планшет QIAFilter наносили 200 мкл суспензии Ni-NTA Superflow, включенной в набор Ni-NTA Superflow 96 BioRobot, и ионообменную смолу уравнивали путем

добавления 600 мкл денатурирующего связывающего буфера (см. выше). Вакуумировали (-15 дюймов рт. ст.) до тех пор, пока весь буфер не проходил через смолу. Очищенные денатурированные образцы из предыдущего этапа затем наносили на 96-луночный планшет QIAFilter® и позволяли связываться в течение 5 мин. Вакуумировали (приблизительно 3 дюйма рт. ст.) в течение приблизительно 5 мин до тех пор, пока все образцы не проходили через смолу. Указанную смолу затем промывали 1 мл денатурирующего связывающего буфера с последующими пятью промывками 1 мл денатурирующего связывающего буфера, содержащим 0,1% Тритон X-100. Затем смолу промывали 15 раз 1 мл денатурирующего связывающего буфера без Тритона X-100. Связавшиеся 6xHis-меченные полипептиды AARS затем вымывали с помощью 450 мкл денатурирующего элюирующего буфера (20 mM фосфат натрия, 500 mM хлорид натрия, 6 M гидрохлорид гуанидина и 500 mM имидазол, pH 7,5) и хранили при 4°C.

Для более масштабной экспрессии на пустую одноразовую колонку "Poly-Prep" (Bio-Rad, кат. № 731-1550) наносили 1 мл суспензии Ni-NTA Superflow (Qiagen, кат. № 30450) и 0,5 мл смолы уравнивали путем добавления 5 мл денатурирующего связывающего буфера (см. выше). Затем на колонку наносили денатурированные тельца включения из предыдущего этапа и позволяли проходить под действием силы тяжести. Смолу сначала промывали 50 мл денатурирующего связывающего буфера с 0,1% Тритона X-100, затем промывали 50 мл денатурирующего связывающего буфера без Тритона X-100. Связавшиеся 6xHis-меченные полипептиды AARS вымывали с помощью 2 мл денатурирующего элюирующего буфера и хранили при 4°C.

Повторная укладка (рефолдинг). Для полипептидов AARS >10 кДа, мембрану Omega 10K 96-луночных фильтрационных планшетов AcroPrep (Pall, кат. № 5034) промывали 20 мкл 1X ФСБ, и планшет помещали на вакуумный коллектор (>10 дюймов рт. ст.) до полного прохождения жидкости. Элюаты из предыдущего этапа (Ni-NTA) распределяли в каждую лунку и вакуумировали до полного прохождения жидкости. Указанные этапы повторяли до тех пор, пока общий объем элюата (450 мкл) не был обработан. Полипептиды AARS восстанавливали путем добавления в каждую лунку 200 мкл буфера для повторной укладки, содержащего 50 mM Tris, 250 mM хлорид натрия, 10 mM хлорид калия, 2 mM хлорид магния, 2 mM хлорид кальция, 400 mM сахарозы, 500 mM аргинина, 1 mM DTT и 0,01% полисорбата 80, pH 7,4, осторожно пипетируя 10 раз, и затем переносили в чистый термоблок. Указанный этап повторяли для получения общего объема 400 мкл на лунку, и термоблок помещали на шейкер на ночь при 4°C. Для полипептидов AARS <10 кДа, элюаты из Ni-NTA наносили на центрифужный фильтр Amicon Ultra-15 с мембраной Ultracel-3 (Millipore, кат. № UFC900308), с последующим добавлением 10 мл буфера для повторной укладки и центрифугированием при 3600 g в течение 10-30 мин до получения объема менее чем 400 мкл. Образцы восстанавливали и дополнительную порцию буфера для повторной укладки добавляли до получения конечного объема 400 мкл. Образцы переносили в 96-луночный термоблок, запечатывали пленкой и помещали на шейкер на ночь при 4°C.

Для более масштабных культур элюаты из Ni-NTA наносили на центрифужный фильтр Amicon Ultra-15 с мембраной Ultracel-3 или Ultracel-10 (Millipore, кат. № UFC900308 или UFC901008, в зависимости от молекулярной массы полипептида AARS) и затем центрифугировали при 3600 g в течение 10-30 мин до уменьшения объема до примерно 500 мкл. Для олигопептидов AARS с pI>7, образцы разбавляли в 20 раз в следующем буфере: 50 mM ацетат натрия, 10 mM хлорид натрия, 0,4 mM хлорид калия, 1 mM ЭДТА, 400 mM сахароза, 500 mM аргинин, 1 mM DTT и 0,01% полисорбат 80, pH 6,0. Для полипептидов AARS с pI<7, образцы разбавляли в 20 раз в следующем буфере: 50 mM Tris, 250 mM хлорид натрия, 10 mM хлорид калия, 2 mM хлорид магния, 2 mM хлорид кальция, 400 mM сахароза, 500 mM аргинин, 1 mM DTT и 0,01% полисорбат 80, pH 8,0. Образцы инкубировали на шейкере при 4°C в течение ночи.

Этапы обессоливания и доочистки. После инкубации в течение ночи 96-луночный термоблок центрифугировали при 3600 g для удаления любых возможных агрегатов. Для супернатантов затем проводили смену буфера на 1X ФСБ (Invitrogen, кат. № 10010). Для полипептидов AARS>10 кДа мембрану Omega 10K 96-луночного фильтрационного планшета AcroPrep промывали 20 мкл 1X ФСБ и указанный планшет помещали на вакуумный коллектор (>10 дюймов рт. ст.) до полного прохождения жидкости. Образцы в буфере для повторной укладки распределяли в каждую лунку и вакуумировали до полного прохождения жидкости. Указанные этапы повторяли до тех пор, пока весь объем образца (400 мкл) не был обработан. Полипептиды AARS восстанавливали путем добавления 180 мкл 1X ФСБ, pH 7,4, в каждую лунку, осторожно пипетируя 10 раз, и затем переносили в чистый термоблок. Указанный этап повторяли для получения общего объема 360 мкл на лунку и термоблок хранили при 4°C. Для полипептидов AARS<10 кДа образцы, подвергнутые повторной укладке, наносили на центрифужный фильтр Amicon Ultra-15 с мембраной Ultracel-3 (Millipore, кат. № UFC900308) с последующим добавлением 10 мл 1X ФСБ и центрифугированием при 3600 g в течение 10-30 мин до получения объема менее чем 360 мкл. Образцы восстанавливали и добавляли 1X ФСБ до получения конечного объема 360 мкл.

Для удаления эндотоксинов фильтрационный планшет AcroPrep Advance с мембраной Mustang Q (Pall, кат. № 8171) промывали 300 мкл 1X ФСБ и центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин для удаления буфера. В фильтрационный планшет добавляли полипептиды AARS (360 мкл/лунку) и инкубировали на шейкере в течение 5-10 мин. Планшет затем центрифугировали при 1000 g в течение 5-10 мин и фракции, прошедшие через фильтр, содержащие полипептиды AARS, собирали и хранили при 4°C.

Для более масштабных культур, после инкубации в течение ночи образцы, подвергнутые повторной укладке, центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин для удаления любых нерастворимых агрегатов. Супернатант наносили на центрифужный фильтр Amicon Ultra-15 и центрифугировали при 3600 g до снижения объема до 250 мкл. Образцы перемешивали в 10 мл 1X ФСБ и снова центрифугировали 3600 g в течение 10-30 мин до получения объема примерно 250 мкл. Необходимо отметить, что pH 1X ФСБ подводили для его соответствия значению pH буфера для повторной укладки (pH 6,0 или pH 8,0). Указанный этап повторяли еще раз, супернатанты восстанавливали и добавляли 1X ФСБ до получения конечного объема 1,5 мл. Для объема 1 л образцы, подвергнутые повторной укладке, диализовали против 1X ФСБ в течение ночи, вместо использования фильтрации.

Для удаления эндотоксинов сильную анионообменную мембрану Sartobind Q 5 (Sartorius, кат. № Q5F) промывали 1 мл 1X ФСБ и полипептиды AARS медленно пропускали через указанную мембрану с использованием пластикового шприца. Прошедшую через мембрану фракцию, содержащую полипептиды AARS, собирали в 96-луночный термоблок с глубокими лунками, который запечатывали и хранили при 4°C.

Биофизическая характеристика. Все очищенные полипептиды AARS исследовали с помощью ДСН-ПААГ, их концентрацию определяли на основе A_{280} и рассчитывали коэффициент экстинкции (программа ProtParam на сервере ExPASy). Уровень эндотоксина измеряли с помощью хромогенного анализа LAL QCL-1000 (Lonza, кат. № 50-648U) в соответствии с инструкциями изготовителя.

Динамическое рассеяние света: Прибор Wyatt Technology DynaPro 99 и датчик температуры (20°C) нагревали в течение 15 мин до начала эксперимента с последующим присоединением программного обеспечения к прибору Dynamics. Время экспозиции устанавливали на 10 с для множественной экспозиции и мощность лазера устанавливали на 100%. Кварцевые кюветы тщательно промывали деионизированной водой и метанолом до добавления белкового образца (15 мкл в концентрации приблизительно 1 мг/мл в ФСБ). Пузырьки воздуха удаляли путем простукивания кюветы до ее помещения в держатель непрозрачной стороной налево. Если интенсивность была слишком высокой (предупреждающее сообщение, показанное на экране), образец дополнительно разбавляли в ФСБ до снижения интенсивности до нормального диапазона. Полученные данные включали гидродинамический радиус, полидисперсность, предсказанную среднюю молекулярную массу, процентную интенсивность и процентную массу.

Эксклюзионная хроматография. Образец белка разбавляли до концентрации примерно 5-10 мг/мл в ФСБ до нанесения на пробоотборную петлю на 100 мкл на хроматограф для ЖЭХБ АКТА, General Electric. Для разделения использовали колонку для эксклюзионной хроматографии Superdex 200 10/300 GL (General Electric, кат. № 17-5175-01). Колонку сначала уравнивали с помощью 1,5 объемов колонки (CV) 1X буфера ФСБ, с последующим вводом образца. Колонку промывали 1 CV 1X буфера ФСБ (изократический ток) с мониторингом абсорбции при 280 нм. Площадь пика интегрировали и рассчитывали процент с помощью программы Unicorn. Элюирующий объем использовали для оценки молекулярной массы на основе сравнения с калибровочными наборами для гель-фильтрации (General Electric, кат. № 28-4038-41 и 28-4038-42).

Восстановление белка после хранения в высокой концентрации: 10 мкл полипептидов AARS, концентрированных до ≥ 10 мг/мл с использованием устройства для фильтрации Amicon Ultra-15 (Millipore, кат. № UFC901024 или UFC900324, в зависимости от молекулярной массы), переносили в чистую микроцентрифужную пробирку. Образец хранили при комнатной температуре в течение одной недели с последующим центрифугированием при 16000 g в течение 10 мин для осаждения любых преципитатов. Концентрацию супернатанта определяли с помощью анализа белка по Брэдфорду и сравнивали с концентрацией, измеренной до воздействия комнатной температуры в течение недели. Восстановление выражали в виде процента от исходной концентрации.

Характеристика полипептидов AARS с помощью ЖХ/МС: Очищенные полипептиды AARS (1 мг/мл) разбавляли в отношении 1:10 в 0,1% муравьиной кислоте и 0,6 мкг белка наносили с помощью автоматического дозатора Dionex на капиллярную колонку C4. Указанную капиллярную колонку готовили путем вырезания 150 мм из трубки из кварцевого стекла (внешний диаметр, OD, -0,36 мм, внутренний диаметр, ID, -0,1 мм, Polymicro Technologies, кат. № 2000023). Один конец капилляра вытягивали с помощью прибора для вытягивания Suter Instrument Laser Fiber и отрезали с помощью резца из кварцевого стекла с получением наконечника диаметром 5 мкм. Капилляр наполняли на длину 75 мм смолой C4 (5 мкм, 300 Å, Michrom, кат. № PM5/64300/00) с использованием баллона высокого давления. ЖХ/МС-анализ проводили на масс-спектрометре типа ионной ловушки TripoFisher LTQ, сопряженного с системой для ЖХВД Dionex Ultimate3000. Анализируемое вещество вымывали из колонки с использованием 35-минутного градиента 5-70% ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте при скорости потока 0,9 мкл/мин. Масс-спектрометр LTQ работал в режиме полного МС-сканирования (300-2.000 m/z) с напряжением при распылении 2,5 кВ.

Сбор данных и анализ. Необработанные масс-спектрометрические данные хранили в файлах RAW, полученных с помощью программы XCalibur на масс-спектрометре LTQ XL. МС-спектры основных пиков, полученных с помощью хроматографа, далее анализировали с помощью деконволюционного алго-

ритма ProMass, TerMoFisher с получением молекулярных масс полипептидов AARS.

Функциональный анализ полипептидов AARS. Анализ транскрипции.

Уровень техники и терапевтическое значение. Кроме традиционной направленной идентификации мишеней, недавно появившиеся геномные технологии обеспечивают важный подход к объяснению механизма действия полипептидов AARS и могут обеспечить непосредственное понимание терапевтического значения на начальных этапах поиска лекарственных средств. Для лучшего понимания возможной терапевтической применимости, первичные клетки человека культивировали в присутствии полипептидов AARS и проводили оценку транскрипционной активности в два отдельных момента времени после инкубации с полипептидами AARS.

Выбор типов клеток для анализа транскрипционной активности основан на плюрипотентных способностях представляющих интерес клеток и потенциальной возможности идентификации полипептидов AARS прямого терапевтического значения. Например, мезенхимальные стволовые клетки (MSC) могут дифференцироваться в остеогенном, адипогенном, хондрогенном, миокардиальном или нейтрональном направлении при подвержении воздействию специфических стимулов, что делает их привлекательным объектом для исследования потенциальной значимости полипептидов AARS для широкого диапазона типов клеток и заболеваний.

Кроме поддержания гематопозитических клеток, клетки костного мозга также могут быть стимулированы к дифференцировке в стромальные клетки костного мозга в различные линии клеток соединительной ткани, такие как кость, хрящ и жир. Потенциальная способность мезенхимальных стволовых клеток человека (hMSC) сохранять мультипотентность и интенсивно пролиферировать *in vitro*, обеспечивает новые пути для клеточной терапии в восстановлении поврежденных или больных тканей. Недавние сообщения также указывают на то, что hMSC способны становиться клетками, пересекающими границы зародышевого листка. Кроме способности дифференцироваться во многие линии мезодермального происхождения, указанные клетки также могут дифференцироваться в нейроны эктодермального происхождения и гепатоцит-подобные клетки энтодермального происхождения. Во время процесса дифференцировки, указанные клетки могут модифицировать паттерны экспрессии специфических транскриптов конкретных линий.

Соответственно, способность конкретных полипептидов AARS модулировать активность конкретных генов в клетках hMSC зависимым от времени образом демонстрирует, что указанные белки играют потенциально важные роли в широком круге путей дифференцировки, а также в заболеваниях и нарушениях, вызванных дисфункцией или нарушением указанных процессов или соответствующего типа клеток. Более того, полипептиды AARS, обладающие способностью модулировать транскрипцию генов в клетках MSC, имеют высокий потенциал терапевтического применения для обеспечения *in vitro* или *in vivo* модуляции гематопоза, нейрогенеза, миогенеза, остеогенеза и адипогенеза, также как и в широком диапазоне нарушения и заболевания, включая например воспалительные ответы, аутоиммунные заболевания, рак, нейрональную дегенерацию, мышечную дистрофию, остеопороз и липодистрофию.

Человеческие клетки скелетной мускулатуры (HskMC) могут дифференцироваться с появлением актомиозиновых миофиламентов, указанные клетки использовались в исследовании генетических мышечных заболеваний, таких как злокачественная гипертермия 1. Клетки HskMC также потенциально возможно использовать в качестве сердечного трансплантата, обеспечивающего восстановление поврежденной ткани сердца. В недавних экспериментах культивируемые человеческие клетки скелетной мускулатуры использовались в исследовании микрогравитации для изучения эффектов условий низкой гравитации на скелетные мышцы человека.

Соответственно, способность конкретных полипептидов AARS модулировать активность конкретных генов в клетках HskMC зависимым от времени образом демонстрирует, что указанные белки играют потенциально важные роли в процессах миогенеза, также как и в заболеваниях и нарушениях, вызванных дисфункцией или нарушением указанных процессов, а также развития или метаболизма мышечных клеток. Соответственно, полипептиды AARS, обладающие способностью модулировать транскрипцию генов в мышечных клетках, обладают потенциалом терапевтического применения при широком диапазоне заболеваний, включая, например, лечение метаболических заболеваний, кахексии, различных состояний мышечной атрофии, также как и скелетно-мышечного заболеваний.

Методы. Способность полипептидов AARS модулировать экспрессию генов оценивали с использованием высокоэффективного микроструйного метода количественной ПЦР в реальном времени (RT-q-ПЦР) (Fluidigm Corporation) (См. Petriv et al. (2010) PNAS (doi/10.1073/pnas.1009320107) в стромальных клетках костного мозга человека (hMSC) и человеческих скелетно-мышечных клетках (HskMC). В экспериментах, описанных в настоящем изобретении, человеческие HskMC (Кат. № 150-05f) и hMSC (Кат. № 492-05f) получали из Cell Applications. Клетки hMSC замораживали на втором пассаже, и их можно культивировать и размножать до 10 удвоений популяции. В настоящем эксперименте использовали hMSC на 6 пассаже. Человеческие клетки скелетной мускулатуры (HskMC) замораживали на втором пассаже, и их можно культивировать и размножать в течение по меньшей мере 15 удвоений популяции. В описанных в настоящем изобретении экспериментах использовали клетки HskMC на 6 пассаже после забора от здорового донора, представляющего собой человека.

В обоих случаях, клетки высевали в концентрации 50000 клеток/мл в объеме 100 мкл ростовой среды и подвергали воздействию полипептидов AARS в концентрации 250 нМ или, как специально указано ниже, в течение 24 ч и 72 ч. Контроли включали среды для дифференцировки со стандартной смесью для обеспечения (1) адипогенеза, (2) остеогенеза, (3) хондрогенеза и (4) образования миотрубочек скелетной мускулатуры. Дополнительные контроли включали необработанные лунки, содержащие только ростовую среду. Для каждого контроля дифференцировки анализировали по две лунки. Контроли: все среды готовили с использованием среды DMEM в качестве основной среды. Эксперименты проводили в соответствии со стандартными литературными данными, среды для дифференцировки получали из Cell Applications. В зависимости от поставщика, среды для дифференцировки содержали следующие добавки: смесь для скелетно-мышечной дифференцировки: эмбриональная бычья сыворотка, инсулин, глутамин, FGF, EGF; смесь для адипогенеза: инсулин, дексаметазон и IBMX; смесь для остеогенеза: эмбриональная бычья сыворотка, дексаметазон, аскорбат-2-фосфат, бета-глицерофосфат; смесь для хондрогенеза: инсулин, аскорбат-2-фосфат и TGF- β 1.

Стандартные протоколы для использования набора для экспрессии генов TAQMAN® Cells-to-CT™ ABI (Applied Biosystems, № AM1728) использовали для лизиса клеток и сбора генетического материала. Смесь ABI Pre-Amp Mix (Applied Biosystems, Item# 4391128) использовали для инициации преамплификации. Ген-специфичные праймеры создавали с использованием программы Primer 3 и получали из IDT technologies. Чипы для анализа Fluidigm (Item # BMK-M-96,96) использовали для действительной количественной ПЦР с использованием стандартных нагрузочных реагентов Fluidigm и пипетирующих устройств. В приведенной ниже табл. E1 перечислены проанализированные гены.

Таблица E1

Список генов, которые оценивали в анализе транскрипции

| Составленный уникальный перечень | refseq_nt | Полное название | Синонимы |
|--|-----------|--|---|
| ABCA1 | NM_005502 | АТФ-связывающая кассета, подсемейство А (ABCA1), член 1 | ABC-1 ABC1 CERP FLJ14958 HDLDT1 MGC164864 MGC165011 TGD |
| ACTB | NM_001101 | актин, бета | PS1TP5BP1 |
| ACTG1 | NM_001614 | актин, гамма 1 | ACT ACTG DFNA20 DFNA26 |
| ACVR2B | NM_001106 | рецептор активина А, тип IIB | ACTRIIB ActR-IIB MGC116908 |
| APOA1 | NM_000039 | аполипопротеин А-I | MGC117399 |
| ARNT | NM_178427 | ядерный транслокатор арил- гидрокарбонового рецептора | HIF-1beta HIF1B HIF1BETA TANGO bHLHe2 |
| BAD | NM_032989 | BCL2-ассоциированный агонист клеточной гибели | BBC2 BCL2L8 |
| BCL2 | NM_000657 | В-клеточная хронический лимфоидный лейкоз/лимфома 2 | Bcl-2 |
| BMP2 | NM_001200 | костный морфогенетический белок 2 | BMP2A |
| BMP4 | NM_130851 | костный морфогенетический белок 4 | BMP2B BMP2B1 MCOPS6 OFC11 ZYME |

| | | | |
|--------|--------------|--|--|
| C3AR1 | NM_004054 | рецептор компонента комплемента 3a 1 | AZ3B C3AR HNFAG09 |
| CASP3 | NM_032991 | каспаза 3, связанная с апоптозом цистеиновая пептидаза | CPP32 CPP32B SCA-1 |
| CAV1 | NM_001753 | кавеолин 1, белок кавеол, 22 кДа | BSCL3 CGL3 MSTP085 VIP21 |
| CDH5 | NM_001795 | кадгерин 5, тип 2 (эндотелий сосудов) | 7B4 CD144 FLJ17376 |
| CFLAR | NM_003879 | CASP8 и FADD-подобный регулятор апоптоза | CASH CASP8AP1 CLARP Casper FLAME FLAME-1 FLAME1 FLIP I-FLICE MRIT c-FLIP c-FLIPL c-FLIPR c-FLIPS |
| COMP | NM_000095 | олигомерный матриксный белок хряща | EDM1 EPD1 MED MGC131819 MGC149768 PSACH THBS5 |
| CSF1 | NM_172212 | колониестимулирующий фактор 1 (макрофаги) | MCSF MGC31930 |
| CTGF | NM_001901 | фактор роста соединительной ткани | CCN2 HCS24 IGFBP8 MGC102839 NOV2 |
| CTNNB1 | NM_001904 | катенин (кадгерин-ассоциированный белок), бета 1, 88 кДа | CTNNB DKFZp686D02253 FLJ25606 FLJ37923 |
| DAAM1 | NM_014992 | Dishevelled-ассоциированный активатор морфогенеза 1 | FLJ41657 KIAA0666 |
| ELN | NM_001081755 | эластин | FLJ38671 FLJ43523 SVAS WBS WS |
| ENO1 | NM_001428 | енолаза 1, (альфа) | ENO1L1 MPB1 NNE PPH |
| FABP3 | NM_004102 | белок, связывающий жирные кислоты, 3, мышцы и сердце (ингибитор роста, произошедший из молочной железы) | FABP11 H-FABP MDGI O-FABP |
| FAK | NM_001199649 | киназа фокальной адгезии | fak1 |
| FGF4 | NM_002007 | фактор роста фибробластов 4 | HBGF-4 HST HST-1 HSTF1 K-FGF KFGF |
| FIGF | NM_004469 | c-fos-индуцированный фактор роста (сосудистый фактор роста эндотелия D) | VEGF-D VEGFD |
| FLT1 | NM_002019 | fms-связанная тирозинкиназа 1 (сосудистый фактор роста эндотелия/рецептор фактора проницаемости сосудов) | FLT VEGFR1 |
| FOXA1 | NM_004496 | Forkhead-бокс A1 | HNF3A MGC33105 TCF3A |
| GAPDH | NM_002046 | глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа | G3PD GAPD MGC88685 |
| GFAP | NM_002055 | глиальный фибриллярный кислый белок | FLJ45472 |

| | | | |
|--------|--------------|--|--|
| SLC2A4 | NM_001042 | Семейство переносчиков растворенных веществ 2 (ускоряющий переносчик глюкозы), член 4 | GLUT4 |
| HAND1 | NM_004821 | экспрессируемый производными сердца и нервного гребня 1 | Hxt Thing1 bHLHa27 eHand |
| HIF1A | NM_181054 | индуцируемый гипоксией фактор 1, альфа субъединица (основной helix-loop-helix-транскрипционный фактор) | HIF-1alpha HIF1 HIF1-ALFA MOP1 PASD8 bHLHe78 |
| HK2 | NM_000189 | гексокиназа 2 | DKFZp686M1669 HKII HXX2 |
| HMGB1 | NM_002128 | бокс группы белков с высокой подвижностью 1 | DKFZp686A04236 HMG1 HMG3 SBP-1 |
| HNF4A | NM_178850 | ядерный фактор гепатоцитов 4, альфа | FLJ39654 HNF4 HNF4a7 HNF4a8 HNF4a9 HNF4alpha MODY MODY1 NR2A1 NR2A21 TCF TCF14 |
| HPRT1 | NM_000194 | гипоксантинфосфорибозилтрансфераза 1 | HGPRT HPRT |
| HSPB1 | NM_001540 | белок теплового шока 1, 27 кДа | CMT2F DKFZp586P1322 HMN2B HS,76067 HSP27 HSP28 Hsp25 SRP27 |
| ICAM1 | NM_000201 | молекула межклеточной адгезии 1 | BB2 CD54 P3,58 |
| IFNG | NM_000619 | интерферон, гамма | IFG IFI |
| IGF1 | NM_001111285 | инсулин-подобный фактор роста 1 (соматомедин C) | IGF-I IGF1A IGFI |
| IGF2 | NM_001127598 | инсулин-подобный фактор роста 2 (соматомедин A) | C11orf43 FLJ22066 FLJ44734 INSIGF pp9974 |
| IGFBP3 | NM_001013398 | связывающий инсулин-подобный фактор роста белок 3 | BP-53 IBP3 |
| IGFBP5 | NM_000599 | связывающий инсулин-подобный фактор роста белок 5 | IBP5 |
| IKKB | NM_001556 | ингибитор энхансера гена легкой цепи каппа в В-клетках, киназа бета | FLJ33771 FLJ36218 FLJ38368 FLJ40509 IKK-beta IKK2 IKKB MGC131801 NFKBIKB |
| IL10 | NM_000572 | интерлейкин 10 | CSIF IL-10 IL10A MGC126450 MGC126451 TGIF |
| IL1B | NM_000576 | интерлейкин 1, бета | IL-1 IL1-BETA IL1F2 |
| IL3 | NM_000588 | интерлейкин 3 (колониестимулирующий фактор, множественное распространение) | IL-3 MCGF MGC79398 MGC79399 MULTI-CSF |
| IL4 | NM_172348 | интерлейкин 4 | BCGF-1 BCGF1 BSF1 IL-4 MGC79402 |
| IL5 | NM_000879 | интерлейкин 5 (колониестимулирующий фактор, эозинофил) | EDF IL-5 TRF |

| | | | |
|--------|-----------|--|---|
| IL6R | NM_181359 | рецептор интерлейкина 6 | CD126 IL-6R-1 IL-6R-alfa IL6RA MGC104991 |
| IL8 | NM_000584 | интерлейкин 8 | CXCL8 GCP-1 GCP1 LECT LUCT LYNAP MDNCF MONAP NAF NAP-1 NAP1 |
| ITGA5 | NM_002205 | интегрин, альфа 5 (рецептор фибронектина, альфа полипептид) | CD49e FNRA VLA5A |
| KDR | NM_002253 | рецептор, содержащий киназный домен (рецепторная тирозинкиназа III типа) | CD309 FLK1 VEGFR VEGFR2 |
| LEP | NM_000230 | лептин | FLJ94114 OB OBS |
| LPL | NM_000237 | липопротеиновая липаза | HDLCQ11 LIPD |
| MAPK11 | NM_002751 | митоген-активируемая протеинкиназа 11 | P38B P38BETA2 PRKM11 SAPK2 SAPK2B p38-2 p38Beta |
| MMP1 | NM_002421 | матриксная металлопептидаза 1 (интерстициальная коллагеназа) | CLG CLGN |
| MMP3 | NM_002422 | матриксная металлопептидаза 3 (стромелизин 1, прожелатиназа) | CHDS6 MGC126102 MGC126103 MGC126104 MMP-3 SL-1 STMY STMY1 STR1 |
| MYH1 | NM_005963 | миозин, тяжелая цепь 1, скелетно-мышечный, взрослый | MGC133384 MYHSA1 MYHa MyHC-2X/D MyHC-2x |
| MYH11 | NM_022844 | миозин, тяжелая цепь 11, гладкомышечный | AAT4 DKFZp686D10126 DKFZp686D19237 FAA4 FLJ35232 MGC126726 MGC32963 SMHC SMMHC |
| MYH7 | NM_000257 | миозин, тяжелая цепь 7, сердечно-мышечный, бета | CMD1S CMH1 DKFZp451F047 MGC138376 MGC138378 MPD1 MYHCB SPMD SPMM |
| MYOD1 | NM_002478 | фактор миогенной дифференцировки 1 | MYF3 MYOD PUM bHLHc1 |
| NFATC1 | NM_172390 | ядерный фактор активированных Т-клеток, цитоплазматический, кальцинейрин-зависимый 1 | MGC138448 NF-ATC NFAT2 NFATc |
| NFATC2 | NM_173091 | ядерный фактор активированных Т-клеток, цитоплазматический, кальцинейрин-зависимый 2 | NFAT1 NFATP |
| NFKB1 | NM_003998 | энхансер гена ядерного фактора легкой цепи каппа полипептида в В-клетках 1 | DKFZp686C01211 EBP-1 KBF1 MGC54151 NF-kappa-B NF-kappaB NFKB-p105 NFKB-p50 p105 p50 |
| NOS2 | NM_000625 | синтаза оксида азота 2, индуцибельная | HEP-NOS INOS NOS NOS2A |
| NOTCH1 | NM_017617 | notch 1 | TAN1 hN1 |

| | | | |
|----------|--------------|--|---|
| NR3C1 | NM_001024094 | ядерный рецептор подсемейства 3, группа C, член 1 (глюкокортикоидный рецептор) | GCCR GCR GR GRL |
| NRP2 | NM_201279 | нейропилин 2 | MGC126574 NP2 NPN2 PRO2714 VEGF165R2 |
| PAX7 | NM_013945 | спаренный бокс 7 | FLJ37460 HUP1 PAX7B RMS2 |
| PDGFB | NM_033016 | бета-полипептид фактора роста тромбоцитов (гомолог онкогена вируса саркомы обезьян (v-sis)) | FLJ12858 PDGF2 SIS SSV c-sis |
| PDK4 | NM_002612 | киназа пируватдегидрогеназы, изозим 4 | FLJ40832 |
| PLA2G1B | NM_000928 | фосфолипаза A2, группа IB (поджелудочная железа) | MGC119834 MGC119835 PLA2 PLA2A PPLA2 |
| PLIN1 | NM_002666 | белок, ассоциированный с липидными каплями | перилипин |
| PPARG | NM_138712 | активируемый пролифератором пероксисом рецептор гамма | CIMT1 GLM1 NR1C3 PPARG1 PPARG2 PPARGgamma |
| QARS | NM_005051 | глутаминил-тРНК-синтетаза | GLNRS PRO2195 |
| RHOA | NM_001664 | семейство генов гомологии ras, член A | ARH12 ARHA RHO12 RHOH12 |
| RUNX1 | NM_001754 | runx-связанный фактор транскрипции 1 | AML1 AML1-EVI-1 AMLCR1 CBFA2 EVI-1 PEBP2aB |
| RXRA | NM_002957 | ретиноидный рецептор X, альфа | FLJ00280 FLJ00318 FLJ16020 FLJ16733 MGC102720 NR2B1 |
| SERPINE1 | NM_001165413 | ингибитор серпиновой пептидазы, ветвь E (нексин, ингибитор активатора плазминогена 1 типа), член 1 | PAI PAI-1 PAI1 PLANH1 |
| SMAD2 | NM_005901 | семейство SMAD, член 2 | JV18 JV18-1 MADH2 MADR2 MGC22139 MGC34440 hMAD-2 hSMAD2 |
| SMAD4 | NM_005359 | семейство SMAD, член 4 | DPC4 JIP MADH4 |
| TERT | NM_198255 | теломераза-обратная транскриптаза | EST2 TCS1 TP2 TRT hEST2 |
| TGFB1 | NM_000660 | трансформирующий фактор роста, бета 1 | CED DPD1 LAP TGFB TGFBeta |
| TGFB3 | NM_003239 | трансформирующий фактор роста, бета 3 | ARVD FLJ16571 TGF-beta3 |
| THBS4 | NM_003248 | тромбоспондин 4 | TSP4 |
| TNF | NM_000594 | фактор некроза опухоли | DIF TNF-alfa TNFA TNFSF2 |
| TUBB | NM_178014 | тубулин, бета | M40 MGC117247 MGC16435 OK/SW-c1,56 TUBB1 TUBB5 |
| TUBB1 | NM_030773 | тубулин, бета 1 | бета-изоформа тубулина (1) |
| TUBG1 | NM_001070 | тубулин, гамма 1 | GCP-1 TUBG TUBGCP1 |
| VCAM1 | NM_080682 | сосудистая молекула клеточной адгезии 1 | CD106 DKFZp779G2333 INCAM-100 MGC99561 |
| VEGFA | NM_003376 | сосудистый фактор роста эндотелия A | MGC70609 MVCD1 VEGF VPF |
| VIM | NM_003380 | виментин | FLJ36605 |
| WISP1 | NM_080838 | белок WNT1-индуцибельного сигнального пути 1 | CCN4 WISP1c WISP1i WISP1tc |
| WNT1 | NM_005430 | семейство сайтов встраивания MMTV wingless-типа, член 1 | INT1 |

Биоинформатический анализ. Данные, полученные в формате.csv с прибора Biomark (Fluidigm), преобразовывали в табличный формат, включающий информацию для образца, мРНК и репликации, наряду с необработанным значением флуоресценции. Реакции ПЦР, которые не проходили, отмечали как отсутствующие. Несколько экспериментов объединяли после нормировки по отношению к общей экспрессии видов мРНК. Все изменения экспрессии мРНК отфильтровывали на основе требований детектирования по меньшей мере в 2 из всех тестируемых биологических повторов. Авторы оценивали среднее

отклонение для технического, биологического и отклонения по набору в целом наборе данных.

Для анализа данных значения C_t для всех интересующих генов сначала нормировали по отношению к средним значениям C_t для "генов домашнего хозяйства" из соответствующего образца для получения значений ΔC_t ($\Delta C_t = C_t$ для гена - C_t для среднего гена "домашнего хозяйства"). Гены из каждого образца затем нормировали к такому же гену в необработанном контроле для получения значений $\Delta\Delta C_t$ ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ контрольный образец - ΔC_t обработанный образец).

Для получения значений кратности изменения активируемые гены (т.е. $\Delta\Delta C_t$ более 0) подвергали следующему расчету: кратность изменения = $2^{\Delta\Delta C_t}$. Для подавляемых генов (т.е. $\Delta\Delta C_t$ s менее 0): кратность изменения = $-(2^{\Delta\Delta C_t})$.

Анализ пролиферации клеток (анализы A1-A11 в таблицах, данных ниже)

Уровень техники и терапевтическое значение.

Способность модулировать скорость пролиферации клеток и апоптоз различных типов клеток является фундаментальным свойством многих терапевтических соединений и имеет прямое значение для лечения и предотвращения широкого диапазона заболеваний и нарушений.

Соответственно, полипептиды AARS, обладающие способностью модулировать скорость пролиферации клеток и/или апоптоза, имеют значительный потенциал терапевтического применения в широком диапазоне заболеваний, включая использование в качестве факторов роста и факторов дифференцировки для стволовых клеток и в схемах лечения для усиления или подавления пролиферации конкретных представляющих интерес типов клеток *in vivo* или *in vitro*, включая, например, гемопоэтические клетки, иммуномодулирующие клетки, раковые клетки, и для лечения и предотвращения заболеваний, связанных с возрастом, включая, например, нейродегенерацию, периферическую нейропатию и потерю мышечного тонуса и тонуса мягких тканей.

Методы. Влияние полипептидов AARS на пролиферацию клеток оценивали с использованием одного или более методов, перечисленных ниже и более конкретно описанных в приведенных ниже методах.

Ноехст 33432. Стандартные методы подсчета клеток для оценки пролиферации осуществляли с использованием красителя Ноехст 33432, который представляет собой проникающий в клетки ядерный контрастный краситель, который испускает синюю флуоресценцию при связывании с дцДНК. Он доступен в виде раствора (Invitrogen Кат. № H-3570), который используется в конечной концентрации 1 мкг/мл в среде или ФСБ. Клетки выращивали в 96-луночных планшетах в присутствии полипептидов AARS в течение стандартного времени роста, составляющего 48 ч или более в зависимости от типа клеток, как описано в приведенных ниже примерах.

АТФ-lite. Клеточный уровень АТФ коррелирует с состоянием здоровья клетки и может быть с легкостью определен с использованием различных коммерчески доступных наборов. Смесь АТФ-lite (Perkin-Elmer, Кат. №6016947 Boston, MA 02481), которая представляет собой гомогенную смесь лизирующего раствора и реагента, детектирующего АТФ, предварительно перемешивали перед применением и использовали в отношении 1:1 (по объему) с культивируемыми клетками. Планшеты инкубировали в течение 5 мин для обеспечения лизиса и планшеты анализировали с использованием люминесцентного спектрофотометра для прочтения планшетов. Клетки выращивали в 96-луночных планшетах в присутствии полипептидов AARS в течение стандартного времени роста, составляющего 48 ч или более в зависимости от типа клеток, как описано в приведенных ниже примерах.

ALAMARBLUE® (Резазурин) представляет собой индикатор выживаемости клеток, который основан на окислительно-восстановительном состоянии клеток. Резазурин, активный ингредиент, представляет собой нетоксичное, способное проникать в клетки соединение, которое имеет синий цвет и по существу не флуоресцирует при существовании в окисленной форме. Однако при проникновении в нормальные жизнеспособные клетки резазурин быстро восстанавливается до резорфина, который продуцирует красный флуоресцентный сигнал. Жизнеспособные клетки непрерывно превращают резазурин в резорфин, таким образом, обеспечивая количественную меру выживаемости и цитотоксичности. Отсутствие токсичности обеспечивает возможность длительной обработки клеток резазурином без негативного влияния; было обнаружено, что клетки, которые выращивали в присутствии резазурина, производили такое же количество жизнеспособных клеток, что и контрольные клетки, при определении с помощью проточного цитометрического анализа.

Измерения проводили путем добавления раствора резазурина/ALAMARBLUE® к клеткам, инкубирования их в течение 1-4 ч и считывания флуоресценции или поглощения. Значение флуоресценции или поглощения пропорционально количеству живых клеток и соответствует метаболической активности клеток. Поврежденные и нежизнеспособные клетки имеют более низкую собственную метаболическую активность и, соответственно, генерируют пропорционально более низкий сигнал по сравнению со здоровыми клетками. После инкубации в присутствии ALAMARBLUE® образцы можно с легкостью анализировать с помощью приборов измерения флуоресценции и абсорбции. Для прочтения флуоресценции использовали следующие параметры для фильтров: возбуждение при 530 нм и испускание при 590 нм.

Клетки выращивали в 96-луночных планшетах в присутствии полипептидов AARS в течение стан-

дартного времени роста, составляющего 48 ч или более в зависимости от типа клеток, и как описано в примерах ниже.

Захват ацетилированных ЛПНП в гепатоцитах человека HepG2C3a (анализ В1 в приведенных ниже таблицах данных)

Уровень техники и терапевтическое значение:

Липопротеины низкой плотности, ЛПНП, являются основным переносчиком холестерина в крови и отвечают более чем за 60% холестерина плазмы крови. У людей рецептор ЛПНП в печени отвечает за клиренс примерно 70% плазматического ЛПНП из циркулирующей крови. Интернализированные ЛПНП разрушаются до свободного холестерина и аминокислот в лизосоме. Печень является основным органом катаболизма ЛПНП и активности рецептора ЛПНП у людей. ЛПНП, которые не интернализируются и остаются в циркулирующей крови, могут транспортироваться эндотелиальными клетками в стенку сосуда, приводя к формированию атеросклеротических бляшек. Циркулирующие ЛПНП также могут захватываться макрофагами, что также может вносить вклад в формирование бляшек. Повышение захвата ЛПНП в ткани печени считается благоприятным для здоровья человека, и разработка безопасных и эффективных способов лечения сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний. Для исследования того, могут ли уникальные свойства полипептидов AARS регулировать захват ацетилированного ЛПНП, использовали стандартный анализ для измерения захвата ацетилированного ЛПНП в клетках HepG2C3a.

Таким образом, полипептиды AARS, обладающие способностью модулировать захват ЛПНП, могут иметь высокий потенциал терапевтического применения при широком диапазоне заболеваний, включая, например, лечение гиперхолестеринемии, гиперлипидемии, диабета 1 и 2 типа, метаболического синдрома и сосудистых заболеваний, включая атеросклероз.

Методы. Клетки HEPG2C3a (ATCC# CRL-10741) поддерживали в минимальной питательной среде Игла (Eagles Minimal Essential medium, EMEM), с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone Cat#SH30910,03), 50 мкг/мл пенициллина/50 мкг/мл стрептомицина, (Invitrogen) в 15 мл среды во флаконах на 75 мл. Клетки выращивали при 37°C, 5% CO₂, в увлажненной среде и работали с ними в вытяжных шкафах с ламинарным потоком воздуха, соответствующих второму классу биологической защиты BSL2 с использованием стерильных методов и соответствующих средств индивидуальной защиты, включая очки, перчатки и лабораторные халаты. HEPG2C3a экспрессируют рецептор ЛПНП и могут захватывать ацетилированный ЛПНП при их культивировании на покрытых коллагеном планшетах с прозрачным дном. Клетки в объеме 100 мкл высевали на покрытые коллагеном планшеты (Invitrogen Cat#A11428) на ночь в полной среде (выше) при плотности посева 50,000 клеток/мл. Клетки промывали один раз ФСБ (Invitrogen Cat# 10010) и в каждую лунку добавляли 80 мкл свободной от сыворотки среды EMEM. В каждую лунку добавляли полипептиды AARS в конечной концентрации 250 нМ на лунку в одинаковом объеме в стерильном ФСБ. В каждую лунку наносили уникальный полипептид AARS. Клетки инкубировали без сыворотки и подвергали воздействию полипептидов AARS в течение 16 ч. Через 16 ч инкубации собирали супернатант и растворимые молекулы ICAM измеряли с использованием стандартного набора для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) фирмы RND Systems (Cat. № DY643) и в каждую лунку добавляли бессывороточную среду с добавлением 5 мкг/мл ас-ЛПНП (Alexa Fluor 488-меченных Cat. № L23380, Invitrogen). Через 2 ч инкубации при 37°C 5% CO₂, клетки промывали дважды стерильным ФСБ перед добавлением 100 мкл ФСБ в каждую лунку для количественной оценки. Планшеты анализировали на предмет общей интенсивности флуоресценции с помощью прочтения дна на флуоресцентном спектрофотометре для прочтения планшетов Victor X5 (Perkin Elmer) при длине волны возбуждения примерно 485 нм и длине волны испускания примерно 535 нм. Клетки окрашивали красителем Hoechst и анализировали интенсивность флуоресценции при возбуждении при 405 нм/испускании при 450 нм для подтверждения стабильности количества клеток по всему планшету.

Регуляция "кислородного взрыва" нейтрофилов и продукции эластазы у человека (анализы C1-C3 в таблицах, данных ниже)

"Кислородный взрыв" нейтрофилов

Уровень техники и терапевтическое значение.

Фагоцитоз полиморфоядерными нейтрофилами и моноцитами представляет собой важную составляющую иммунной защиты организма от инфекций, вызванных микроорганизмами, включая бактерии и грибы. Процесс фагоцитоза может быть разделен на несколько основных этапов: хемотаксис (миграция фагоцитов к сайтам воспаления), присоединение частиц к клеточной поверхности фагоцитов, поглощение (фагоцитоз) и внутриклеточное уничтожение по кислород-зависимым (окислительный взрыв) и кислород-независимым механизмам. Снижение или отсутствие активности кислородного взрыва наблюдается при врожденных дефектах, таких как хронические грануломатозные заболевания (CGD). CGD представляют собой гетерогенную группу наследуемых нарушений, которые обычно проявляются во время первых двух лет жизни. Заболевание характеризуется повторяющимися и угрожающими жизни инфекциями, вызванными бактериальными и грибковыми организмами. Указанные инфекции, как правило, включают пневмонию, лимфаденит или абсцесс, который поражает лимфатические узлы, легкие и пе-

чень. NADPH-оксидаза представляет собой ферментативную систему, отвечающую за продукцию супер-оксид-аниона, который быстро превращается в перекись водорода и гидроксильные радикалы. Нарушения пептидов, входящих в состав ферментативной системы NADPH-оксидазы, приводит к дисфункциям, характерным для CGD. Нейтрофилы, полученные от пациентов, страдающих CGD, не могут обеспечивать значительные реакции окислительного взрыва после стимуляции. Описаны различные формы CGD (классический X-связанный CGD и аутосомные рецессивные варианты). Реакции окислительного взрыва гранулоцитов нарушены при трансплантации, на поздних стадиях ВИЧ-инфекции и у пожилых людей, что делает указанные популяции более чувствительными ко вторичной инфекции и обострениям воспалительного заболевания. Различные иммуномодуляторы (например, цитокины (GM-CSF, G-CSF, TNF) или лекарственные средства) также оказывают эффекты на окислительный взрыв. Существуют белки, обладающие потенциальной способностью активировать или подавлять окислительный взрыв на терапевтическом уровне, применимые для различных стадий заболеваний.

Способы. Лиганд протеинкиназы C фобол-12-миристат-13-ацетат (PMA) может использоваться в указанном анализе в качестве агониста процесса окислительного взрыва. Гепаринизированную цельную кровь перемешивали со стерильным декстраном (конечная концентрация 0,6%) в течение 1 ч и позволяли разделяться на слои. Нижний слой содержал нейтрофилы, моноциты и эритроциты. Для удаления всех эритроцитов проводили этап лизиса с использованием хлорида аммония, и после указанного этапа лизиса оставалась на 97% чистая популяция нейтрофилов, загрязненная моноцитами примерно на 3%. При стимуляции гранулоциты и моноциты продуцируют реактивные метаболиты кислорода (супероксид-анион, перекись водорода, гипохлорную кислоту), которые разрушают бактерии внутри фагосомы. За образованием реактивных оксидантов во время окислительного взрыва можно наблюдать путем добавления и окисления Amplex Red. Затем анализировали процент клеток, которые продуцировали реактивные кислородные радикалы, а также их среднюю интенсивность флуоресценции с использованием флуоресцентного спектрофотометра для прочтения планшетов. Как правило, время указанной реакции составляло 10 мин, при этом очевидный кислородный взрыв наблюдали в течение 2 мин, а уменьшение сигнала наблюдали в течение 20 мин. Указанный анализ можно проводить по принципу агонизма в отсутствие PMA или по принципу антагонизма, с сопутствующим введением полипептидов AARS и PMA в концентрации, которая является ниже EC_{50} для указанного соединения.

Регуляция продукции эластазы нейтрофилами человека

Уровень техники и терапевтическое значение.

Эластаза нейтрофилов представляет собой сериновую протеазу, которая, как считается, играет специфическую роль в развитии широкого диапазона заболеваний человека, включая воспалительные нарушения легких и сердечно-сосудистой системы. Несмотря на ее ключевую физиологическую роль во врожденной иммунной защите организма, она также может принимать участие в ремоделировании тканей и обладает стимулирующим влиянием на секрецию, которые сейчас считаются важными сигналами для локального воспаления. В течение нескольких десятилетий считается, что активность эластазы нейтрофилов вовлечена в развитие эмфиземы, однако только относительно недавно была признана патогенная функция указанной сериновой протеазы в ситуациях, когда происходит избыточное отложение внеклеточного матрикса. Благодаря применению моделей генетически модифицированных животных начинают объясняться возможные пути влияния ее действия на фиброзную репарацию легких. Появляющиеся доказательства дают основания полагать, что вовлечение клеточных путей, имеющих более прямое действие на продукцию фиброгенного медиатора и синтез коллагена содействует обеспечению накопления легочного матрикса под действием эластазы нейтрофилов. Эластаза нейтрофилов человека также присутствует в атеросклеротических бляшках, где она вносит вклад в разрушение матрикса и ослабление стенки сосуда, ассоциированное с осложнениями образования аневризмы и разрывом атеросклеротической бляшки. Эластаза связана с другими внеклеточными протеазами в указанных процессах, но широкий диапазон субстратов и ее активность, сопряженная с дегрануляцией нейтрофилов, позволяет выделять указанную деструктивную протеазу как терапевтическую мишень при атеросклеротическом заболевании.

Методы. В указанном анализе использовали набор ENZCHEK® (Invitrogen Кат. № E-12056) для анализа эластазы. Нейтрофилы получали из свежей крови человека с использованием 6% раствора декстрана и эритроциты лизировали до помещения клеток в среду RPMI (среда должна быть без добавления сыворотки и антибиотиков). Исходный раствор субстрата эластина DQ (1,0 мг/мл) готовили путем добавления 1,0 мл деионизированной воды (dH_2O) непосредственно к одной из трех пробирок, содержащих лиофилизированный субстрат, и перемешивания для достижения растворения. Однократный реакционный буфер готовили путем разбавления 6 мл 10X реакционного буфера в 54 мл dH_2O . 100 мкг/мл рабочего раствора субстрата эластина DQ готовили путем разбавления исходного раствора эластина DQ в десять раз 1X реакционным буфером. Исходный раствор свиной панкреатической эластазы готовили путем приготовления исходного раствора 100 Ед/мл в dH_2O . Для анализа на предмет эластазной активности, 50 мкл 1X реакционного буфера наносили в каждую аналитическую лунку, содержащую 500000 нейтрофилов/мл в объеме 30 мкл. Добавляли 8 мкл каждого полипептида AARS на лунку и образец инкубировали в течение 20 мин при 37°C. В каждую лунку добавляли 50 мкл рабочего раствора (100 мкг/мл) эластина

DQ и перемешивали. Образцы инкубировали при комнатной температуре в защищенном от света месте в течение 30 мин. Интенсивность флуоресценции можно измерять на флуоресцентном спектрофотометре для считывания планшетов, снабженном стандартными флуоресцеиновыми фильтрами (возб. 485/исп.535), для нескольких временных точек.

Связывание с Toll-подобными рецепторами и активация NFκB (анализы D1-D4 в таблицах данных, ниже)

Уровень техники и терапевтическое значение. Макрофаги играют основную роль во врожденном иммунитете и экспрессируют большой набор различных классов рецепторов распознавания структур (PRR), включая семейство Toll-подобных рецепторов (TLR), которые являются мощными регуляторами и контролерами иммунного ответа.

Стимуляция TLR микробными патогенами и эндогенными лигандами инициирует сигнальные каскады, которые вызывают секрецию провоспалительных цитокинов и эффекторных цитокинов, которые направляют последующие реакции приобретенного иммунитета. Эндогенные лиганды, также как и микробные компоненты, распознаются TLR и могут активировать TLR, что дает возможность предполагать, что указанные рецепторы могут представлять собой ключевую мишень для разработки новых терапий для множества заболеваний.

Таким образом, полипептиды AARS, которые модулируют активность рецепторов TLR, обладают потенциалом терапевтического применения для широкого круга заболеваний и нарушений, включая, например, воспалительные заболевания и нарушения, аутоиммунные заболевания, отторжение тканевого трансплантата/отторжение органа, предотвращение или лечение рака, модуляцию гематопоеза и инфекцию.

Измерение активации TLR в клетках RAW-BLUE

Мышиные макрофаги, продающиеся под торговой маркой RAW-BLUE™ (Invivogen, Catalog code: raw-sp), экспрессируют все TLR, за исключением TLR5, и включают ген секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP), который индуцируется транскрипционными факторами NFκB и AP-1. При стимуляции TLR, клетки RAW-BLUE™ активируют NFκB и/или AP-1, приводя к секреции SEAP, который поддается измерению с помощью среды для детектирования SEAP.

Методы. Клетки RAW-BLUE™ промывали дважды ФСБ, трипсинизировали и ресуспендировали в свежей ростовой среде (ростовая среда: DMEM, 4,5 г/л глюкоза, 10% термоинактивированная эмбриональная бычья сыворотка (30 мин при 56°C), 100 мг/мл ZEOCIN™, 2 mM L-глутамин). Клетки высевали в концентрации 50000 клеток/лунку в 96-луночных планшетах в общем объеме 100 мкл и в каждую лунку добавляли полипептиды AARS, контроли или полипептиды AARS (+LPS) в концентрациях, показанных в экспериментах, изложенных ниже. Клетки инкубировали при 37°C в инкубаторе при 5% CO₂ в течение 18 ч. На 2 день эксперимента готовили среду для детектирования SEAP (QUANTM-BLUE™) (Invivogen Catalog code: rep-qb1) в соответствии с инструкциями и добавляли в 96-луночный планшет с плоским прозрачным дном в объеме 120 мкл на лунку, затем добавляли супернатант клеток (20 мкл). Образцы инкубировали при 37°C в течение от примерно 30 мин до 2 ч. Уровень SEAP определяли с использованием спектрофотометра и путем считывания абсорбции при 650 нм.

Для детектирования полипептидов AARS, которые специфично блокируют активацию TLR, указанный анализ можно модифицировать для идентификации потенциальных антагонистов TLR. В указанном случае полипептиды AARS добавляли к клеткам в конечной концентрации примерно 250 нМ на лунку, (или как специально указано в приведенных ниже примерах) за 1 ч до добавления 50 нг/мл LPS. Клетки инкубировали и выявляли SEAP, как описано выше. Контрольные лунки, содержащие ФСБ в отсутствие LPS или только добавленный полипептид AARS, использовали для оценки фонового уровня стимуляции TLR во время измерения. Контрольные лунки предварительно обрабатывали ФСБ и известными агонистами и антагонистами TLR. Отношение вычитаемого фона [сигнал ФСБ плюс LPS] к [сигналу полипептида AARS плюс LPS] использовали для определения процентного антагонизма.

Скрининг TLR человека в клетках HEK293

Клетки человека HEK293 представляют собой генетически модифицированные клетки и продаются под торговой маркой клетки HEK-Blue™ TLR (Invivogen). Варианты TLR2 и TLR4 указанного типа клеток селективно экспрессируют все TLR2 или TLR4 и содержат репортерный ген секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под контролем минимального промотора IFN-бета, слитого с пятью сайтами связывания транскрипционных факторов NFκB и AP-1. При использовании специфических агонистов TLR 2 или 4 (соответственно), клетки HEK-BLUE™ TLR2 и HEK-BLUE™ TLR4 активируют NFκB и/или AP-1, приводя к секреции SEAP, который поддается измерению при использовании реагента для детектирования SEAP. Клетки HEK-BLUE™ TLR2 являются ко-трансфицированными LPS-ко-рецепторным белком CD14 для усиления чувствительности TLR2 и улучшения качества сигнала. Исходная клетка экспрессирует эндогенный уровень TLR1, 3, 5, 6, а также NOD1.

Методы. Клетки HEK-BLUE™-TLR2 или HEK-BLUE™-TLR4 промывали дважды ФСБ, трипсинизировали и ресуспендировали в свежей ростовой среде (ростовая среда: DMEM, 4,5 г/л глюкоза, 10% термоинактивированная эмбриональная бычья сыворотка (30 мин при 56°C), 100 мг/мл ZEOCIN™, 2 mM

L-глутамин). Клетки высевали в концентрации 50000 клеток/лунку в 96-луночный планшет в общем объеме 100 мкл и в каждую лунку добавляли полипептиды AARS, контроли или полипептиды AARS (+LPS) в концентрациях, показанных в экспериментах, изложенных ниже. Клетки инкубировали при 37°C в инкубаторе при 5% CO₂ в течение 18 ч. На 2 день эксперимента готовили среду для детектирования SEAP (QUANTI-BLUE™) (Invivogen Catalog code: rep-qb1) в соответствии с инструкциями и добавляли в 96-луночный планшет с плоским прозрачным дном по 120 мкл на лунку, затем добавляли клеточный супернатант (20 мкл). Образцы инкубировали при 37°C в течение примерно 30 мин вплоть до 2 ч. Уровень SEAP определяли с использованием спектрофотометра и путем считывания абсорбции при 650 нм. Контрольные лунки предварительно обрабатывали ФСБ и известными агонистами TLR, такими как UltraPure LPS (TLR-4) или PAM3CSK4 (TLR-2). Отношение вычитаемого фона [сигнал ФСБ плюс LPS] к [сигналу полипептида AARS плюс LPS] использовали для определения процентного агонизма.

Высвобождение цитокинов (Анализы E1-E17 в таблицах, данных ниже)

Уровень техники и терапевтическое значение. Цитокины представляют собой набор разнообразных низкомолекулярных белковых молекул клеточной передачи сигнала, которые широко используются для межклеточного взаимодействия и играют важные роли в поддержании нормального гомеостаза тела, включая иммуномодуляцию и регуляцию. Таким образом, полипептиды AARS, которые модулируют высвобождение или биологическую активность цитокинов, обладают потенциалом терапевтического применения при широком диапазоне заболеваний и нарушений, включая, например, воспалительные заболевания и нарушения, аутоиммунные заболевания, отторжение тканевого трансплантата/отторжение органа, предотвращение или лечение рака, модуляцию гематопоеза и инфекции.

Высвобождение цитокинов из клеток в культуре

Методы. Анализируемые клетки высевали в 24-луночный планшет при плотности примерно 1 миллион клеток на лунку в 1 мл ростовой среды. Клетки обрабатывали либо полипептидом AARS (в концентрациях, показанных в приведенных ниже примерах), либо равным объемом ФСБ, и инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. После обработки клеток образцы центрифугировали при 4°C на центрифуге с бакет-ротором при 2000×g в течение 5 мин. Среду осторожно собирали таким образом, чтобы не разрушить клеточный осадок, и переносили в новую пробирку. Образцы сразу исследовали или быстро замораживали в жидком азоте для последующего анализа. Высвобождение цитокинов (включая цитокины MIF, IL-8, IL-10, серпин E1, GM-CSF, GRO, IL-1 альфа, IL-1 бета, IL-1ra, IL-6, MCP-1, MIP-1, RANTES и TNF-альфа) оценивали с использованием коммерчески доступных наборов (R&D Systems, Inc, MN, США) или на основании контракта при помощи исследовательской организации (MD Biosciences (Сент-Пол, Миннесота)).

Высвобождение цитокинов из цельной крови человека

Методы. Цельную кровь человека получали от здоровых доноров, представляющих собой людей, и собирали в стандартные пробирки с гепарином для сбора образцов. Кровь использовали в день ее получения, чтобы гарантировать адекватное состояние здоровья клеток. Кровь осторожно перемешивали и помещали в объеме 100 мкл в 96-луночные поликарбонатные планшеты с V-образным дном. Добавляли полипептиды AARS и медленно перемешивали их с кровью 2 раза с использованием многоканальной пипетки, установленной на 50 мкл. Для всех экспериментальных работ использовали наконечники с фильтром и полный комплект средств индивидуальной защиты (PPE). Вся экспериментальная работа проводилась в вытяжном шкафу соответствующего класса биозащиты, который являлся подходящим для проведения экспериментальной работы с кровью человека. Кровь инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. После обработки клеток образцы центрифугировали на центрифуге с бакет-ротором при 2000×g в течение 5 мин. Супернатант собирали для проведения иммуноферментных анализов (ELISA) цитокинов. ELISA проводили, как описано ранее.

Высвобождения цитокинов из клеток THP-1 и HL60

Методы. Клетки THP1 и HL60 выращивали в среде RPMI-1640+10% эмбриональной бычьей сыворотки и высевали в концентрации 1×10⁶ клеток/мл в 96-луночные планшеты. Клетки обрабатывали в течение 48 ч полипептидами AARS в концентрации 250 нМ, если иное не указано. Указанные два типа клеток, как правило, считаются моноцитоподобными или макрофагподобными и имеют много маркеров, которые дают основания считать их клетками миелоидного ряда. Таким образом, указанные клетки производят многочисленные различные цитокины в ответ на различные биологические стимулы и часто используются для исследования воспалительных и противовоспалительных ответов *in vitro*. Высвобождение цитокинов (включая цитокины MIF, IL-8, IL-10, Серпин E1, GM-CSF, GRO, IL-1 альфа, IL-1 бета, IL-1ra, IL-6, MCP-1, MIP-1, RANTES и TNF-альфа) определяли с использованием коммерчески доступных наборов (R&D Systems, Inc, Миннесота, США) или на основании контракта при помощи исследовательской организации (MD Biosciences (Сент-Пол, Миннесота)).

Высвобождение цитокинов из мононуклеаров периферической крови

Методы. Для изолирования мононуклеаров периферической крови свежеполученную человеческую цельную кровь медленно наносили на HISTOPAQUE®-1077 (Sigma) в отношении 1:1 в конические пробирки на 50 мл при комнатной температуре. Нанесенные образцы центрифугировали при 400×g в клини-

ческой центрифуге, снабженной бакет-ротором, в течение 30 мин при комнатной температуре без торможения. Затем слой лейкоцитов на границе раздела между плазмой и градиентом плотности удаляли с помощью пипетки. Указанные клетки, представляющие собой мононуклеары периферической крови, промывали дважды средой RPMI-1640 (Invitrogen #22400-105) посредством разбавления и центрифугирования в течение 10 мин при 250×g. Промытые PBMC ресуспендировали в среде RPMI-1640+10% эмбриональной бычьей сыворотки и высевали в концентрации 1×10^6 клеток/мл.

Высвобождение цитокинов из синовиоцитов человека

Уровень техники и терапевтическое значение.

Большое количество исследований показало, что IL-6 и IL-8 продуцируются на повышенном уровне при некоторых заболеваниях и, таким образом, могут играть фундаментальную роль в патогенезе воспалительного заболевания. IL-6 активирует продукцию клеток эндотелия, приводя к высвобождению IL-8 и белков-хемоаттрактантов моноцитов, экспрессии молекул адгезии и привлечения лейкоцитов в места воспаления. Указанные цитокины экспрессируются в типах клеток, ассоциированных с воспалительными заболеваниями, включая клетки, вовлеченные в патогенез системного ювенильного артрита, системной красной волчанки, болезни Крона и ревматоидного артрита. Одним из наиболее важных системных эффектов продукции цитокинов является индукция ответа острой фазы. Белки острой фазы в основном продуцируются печенью и включают белки, которые обеспечивают иммунный ответ путем активации компонентов комплемента, индукции провоспалительных цитокинов и стимуляции хемотаксиса нейтрофилов. В альтернативном варианте ответ острой фазы может иметь полезное действие, и белки острой фазы, такие как антагонисты протеиназы, опонины и прокоагулянты, помогают ограничивать разрушение ткани путем разрешения воспаления. В частности, IL-6 может стимулировать пролиферацию синовиоцитов и активацию остеокластов, приводя к образованию синовиального паннуса и репарации. IL-6 действует вместе с IL-1 для повышения продукции матриксных металлопротеиназ, которые могут вносить вклад в разрушение суставов и хряща. Однако IL-6 также может оказывать защитное действие в суставах, что было предположено на основании открытия, что указанный цитокин вызывает экспрессию тканевого ингибитора металлопротеиназ и стимулирует синтез протеогликанов при инъекции в суставы мышей, страдающих антиген-индуцированным артритом. Фибробласто-подобные синовиоциты ревматоидного артрита человека (HFLS-RA) выделяли из синовиальных тканей, полученных от пациентов, страдающих ревматоидным артритом (RA). Они были заморожены на втором пассаже и их можно культивировать и размножать по меньшей мере в течение 5 удвоений популяции. Давно известна роль HFLS в разрушении суставов путем продукции цитокинов и металлопротеиназ, которые вносят вклад в дегенерацию хряща.

Соответственно, полипептиды AARS, обладающие способностью модулировать рост, дифференцировку или профиль высвобождения цитокинов фибробластоподобных синовиоцитов ревматоидного артрита (HFLS-RA) обладают потенциалом терапевтического применения при широком диапазоне заболеваний, включая, например, лечение воспалительных заболеваний и нарушений, включая системный ювенильный артрит, системную красную волчанку, болезнь Крона и ревматоидный артрит.

Методы. Взрослые клетки HFLS-RA (Cell Applications Кат. № 408RA-05a) поддерживали в ростовой среде для синовиоцитов (Cell Applications Кат. №415-50) в 15 мл среды во флаконах на 125 мл в течение 1 пассажа до использования. Клетки поддерживали при 37°C, 5% CO₂, в увлажненной среде и работали с ними в вытяжных шкафах с ламинарным потоком воздуха 2 класса биозащиты BSL2 с использованием стерильных методов и соответствующих средств индивидуальной защиты, включая очки, перчатки и лабораторные халаты. Клетки в объеме 80 мкл высевали на ночь в ростовой среде при плотности клеток примерно 50000 клеток/мл. После прикрепления в течение ночи в каждую лунку добавляли полипептиды AARS в стерильном ФСБ в конечной концентрации 250 нМ на лунку (или как специально указано в приведенных ниже примерах). Контрольные лунки содержали необработанные клетки и инкубировались с эквивалентным объемом ФСБ. Клетки подвергали воздействию белков или ФСБ в основной среде (Cell Applications Кат. №310-470) в течение 24 ч. Супернатант удаляли и проводили ELISA-анализ IL-8, IL-6 и TNFα в соответствии с инструкциями производителя (RND Systems, Кат. № DY206 и с наборами Duo-set DY-208, DY-210). Пролиферацию оценивали с помощью резазурина, как описано ранее, путем добавления свежей среды, содержащей резазурин, в планшеты после удаления супернатанта и инкубирования в течение трех часов при 37°C. Планшеты анализировали с помощью флуоресцентного спектрофотометра для прочтения планшетов и выживаемость/пролиферацию выражали как функцию связанной с резорудином флуоресценции обработанных полипептидом AARS лунок, деленную на связанную с резорудином флуоресценции лунок, обработанных только ФСБ.

Пролиферация и продукция воспалительных цитокинов астроцитами человека

Уровень техники и терапевтическое значение. Астроциты человека (HA) представляют собой астроциты, которые являются производными коры головного мозга человека. Их замораживают на втором пассаже и их можно культивировать и размножать до 10 удвоений популяции. HA являются наиболее многочисленными клетками в центральной нервной системе и выполняют много функций, таких как обеспечение механической поддержки и доставка питательных веществ нейронам и удаление продуктов

жизнедеятельности из нейронов. Помимо того, что астроциты играют важную поддерживающую роль для оптимального функционирования нейронов, они также обеспечивают снабжение биохимическими веществами клеток эндотелия, которые формируют гематоэнцефалический барьер. Недавние исследования показали, что астроциты способны регулировать нейрогенез путем запуска нейрогенной дифференцировки стволовых клеток и контроля функции одиночных синапсов, принимать активное участие в передаче и хранении информации в мозге. Осознание важной роли астроцитов в функционировании нервной системы повышается. НА могут служить полезной моделью для исследования разнообразия функций астроцитов *in vitro*. Было показано, что астроциты пролиферируют в ответ на IL6 и TNF- α . Кроме того, указанные клетки способны создавать свой собственный IL6 и TNF- α . Таким образом, полипептиды AARS, которые модулируют пролиферацию и продукцию цитокинов в клетках НА, обладают потенциалом терапевтического применения для различных неврологических заболеваний, включая нейровоспаление, нейродегенерацию, образование опухоли мозга и ишемию и регенерацию мозга.

Методы. Астроциты человека (НА) из Cell Applications (Кат. № 882K-05f) поддерживали в ростовой среде для клеток НА (Cell Applications, Кат. № 821-500) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки поддерживали при 37°C, 5% CO₂, в увлажненной среде и работали с ними в вытяжных шкафах с ламинарным потоком воздуха 2 класса биозащиты BSL2 с использованием стерильных методов и соответствующих средств индивидуальной защиты, включая очки, перчатки и лабораторные халаты. Клетки в объеме 80 мкл высевали на покрытые коллагеном планшеты на ночь в полной среде (выше) при плотности клеток 50000 клеток/мл. Клетки промывали один раз ФСБ и в каждую лунку добавляли 80 мкл бессывороточной ростовой среды. В каждую лунку добавляли полипептиды AARS в конечной концентрации 250 нМ на лунку (или как специально описано в приведенных ниже примерах) в постоянном объеме в стерильном ФСБ. Клетки подвергали воздействию полипептидов AARS в течение 48 ч и отработанную среду удаляли для анализа цитокинов (как описано ранее). Клетки подвергали воздействию белков или ФСБ в основной среде (Cell Applications Кат. №310-470) в течение 48 ч. Супернатант удаляли и проводили анализы на IL-8 и IL-6 методом твердофазного ИФА в соответствии с инструкциями производителя (RND Systems, Кат. № DY206 и наборы Duo-set DY-208, DY-210). Пролиферацию оценивали с помощью резазурина, как описано ранее, путем добавления свежей среды, содержащей резазурин, в планшеты после удаления супернатанта и инкубирования в течение трех часов при 37°C. Планшеты анализировали с помощью флуоресцентного спектрофотометра для прочтения планшетов и выживаемость/пролиферацию выражали как функцию связанной с резорудином флуоресценции обработанных полипептидом AARS лунок, деленную на связанную с резорудином флуоресценцию лунок, обработанных только ФСБ.

Пролиферация и продукция воспалительных цитокинов клетками эндотелия микрососудов легкого человека (HLMVEC)

Уровень техники и терапевтическое значение. Легочная сосудистая система имеет огромное физиологическое/патологическое значение. Сейчас считается, что она представляет собой ткань, которая состоит из метаболически активных, функционально эффективных клеток, которые взаимодействуют с циркулирующими субстратами и форменными элементами крови таким образом, что регулируют состав системной артериальной крови, влияют на функции органа-мишени и вносят вклад в тромбоз, гемостаз и иммунные реакции, в также опухолевый метастаз. Эндотелиальные клетки микрососудов легкого человека (HLMVEC) обладают повышенной экспрессией хемоаттрактантных цитокинов и молекул клеточной адгезии, которые обеспечивают ключевой сигнал для направления миграции лейкоцитов в легкие во время острого повреждения легких. Эти первичные клетки могут быть полезным инструментом для изучения различных аспектов патологии и биологии легочной микроваскуляризации *in vitro*. Изменение в структуре и функции микроваскуляризации в ответ на воспалительные стимулы считается ключевым фактором в повреждении органов и при соответствующих условиях может обеспечивать стимул для репарации. Важной причиной указанных сосудистых изменений является индукция воспалительной реакции, вовлекающей инфильтрацию лейкоцитов. С помощью различных исследований, сфокусированных на адгезии гранулоцитов к эндотелию, было выявлено, что в привлечение и эмиграцию лейкоцитов вовлечен хорошо организованный адгезионный каскад. Указанный адгезионный каскад инициируется, когда гранулоцит прикрепляется к эндотелию и начинает "катиться" в направлении тока жидкости с низкой скоростью. По мере качения гранулоцита он активируется, затем плотно адгезирует к эндотелию и мигрирует через эндотелий во внесосудистое пространство. Указанные адгезионные события опосредуются, отчасти, молекулярными взаимодействиями, которые происходят между CAM на поверхности гранулоцитов и соответствующими гликопротеинами, присутствующими на эндотелии. Различные исследования показали, что молекула клеточной адгезии эндотелия Е-селектин может взаимодействовать с лигандами гранулоцитов, презентующих гликан типа SLe^x для опосредования этапов прикрепления и качения в адгезионном каскаде. Последующие этапы каскада вовлекают взаимодействие экспрессируемых эндотелием молекул межклеточной адгезии с экспрессируемыми гранулоцитами интегринами CD18.

Таким образом, полипептиды AARS, которые модулируют пролиферацию и/или продукцию цитокинов в клетках эндотелия микрососудов легкого человека обладают потенциалом терапевтического применения при различных сосудистых и легочных заболеваниях, включая воспалительные и обструк-

тивные заболевания легких, включая, например, легочную гипертензию, хроническое обструктивное заболевание легких, идиопатический фиброз легких и астму.

Методы. Клетки HLMVEC (Cell Applications, Кат. № 540-05) поддерживали в ростовой среде для клеток эндотелия микрососудов Cell Applications (Кат. № 111-500). Для приемлемого роста клеток использовали раствор фактора для прикрепления клеток, содержащий коллаген (Cell Applications, Кат. № 123-100), для покрытия планшетов и флаконов до помещения на них клеток. Клетки поддерживали при 37°C, 5% CO₂, в увлажненной среде и работали с ними в вытяжных шкафах с ламинарным потоком воздуха 2 класса биозащиты BSL2 с использованием стерильных методов и соответствующих средств индивидуальной защиты, включая очки, перчатки и лабораторные халаты. Клетки в объеме 80 мкл помещали на покрытые коллагеном планшеты на ночь в полной среде (выше) при плотности клеток 50000 клеток/мл. Клетки промывали один раз ФСБ и в каждую лунку добавляли 80 мкл бессывороточной ростовой среды. В каждую лунку добавляли полипептиды AARS в стерильном ФСБ в конечной концентрации 250 нМ на лунку (или как специально описано в приведенных ниже примерах) в постоянном объеме. Клетки подвергали воздействию полипептидов AARS в течение 48 ч и отработанную среду удаляли для анализа методом твердофазного ИФА для оценки молекул клеточной адгезии и цитокинов (как описано ранее). Молекулы клеточной адгезии, включая растворимые VCAM и/или ICAM, измеряли с использованием стандартного набора для ELISA, полученного из RND Systems (Кат. № DY643 и DY720 соответственно). Пролиферацию оценивали с помощью резазурина, как описано ранее, путем добавления свежей среды, содержащей резазурин, в планшеты после удаления супернатанта и инкубирования в течение трех часов при 37°C. Планшеты анализировали с помощью флуоресцентного спектрофотометра для прочтения планшетов и выживаемость/пролиферацию выражали как функцию связанной с резорудином флуоресценции обработанных полипептидом AARS лунок, деленную на связанную с резорудином флуоресценции лунок, обработанных только ФСБ.

Адгезия клеток (анализы F1-F7 в таблицах, данных ниже)

Уровень техники и терапевтическое значение. Молекулы клеточной адгезии (CAM) представляют собой белки, расположенные на поверхности клетки, которые вовлечены в связывание с другими клетками или с внеклеточным матриксом (ВКМ) в процесс, называемый клеточной адгезией. Указанные белки, как правило, представляют собой трансмембранные рецепторы и состоят из трех доменов: внутриклеточного домена, который взаимодействует с цитоскелетом, трансмембранного домена и внеклеточного домена, который взаимодействует либо с другими молекулами CAM того же типа (гомофильное связывание), либо с другими CAM или внеклеточным матриксом (гетерофильное связывание). Большинство CAM принадлежит четырём семействам белков: суперсемейство Ig (иммуноглобулинов) (IgSF CAM), интегринов, кадгеринов и селектинов. Молекулы клеточной адгезии суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) представляют собой кальций-независимые трансмембранные гликопротеины, включая: нейрональные молекулы клеточной адгезии (NCAM), межклеточные молекулы клеточной адгезии (ICAM), сосудистые молекулы клеточной адгезии (VCAM), молекулы клеточной адгезии тромбоцитов/клеток эндотелия (PECAM-1), селективные для клеток эндотелия молекулы адгезии (ESAM), молекулы адгезии контактов (JAM), нектины и другие молекулы клеточной адгезии.

Молекулы клеточной адгезии представляют собой гликопротеины клеточной поверхности, которые являются критичными для адгезии лейкоцитов к эндотелию синусоидов и трансмиграции и цитотоксичности при различных воспалительных заболеваниях печени. ICAM-1 играет важную роль в воспалении, и повышенная экспрессия ICAM-1 на эндотелиальных клетках отражает активацию клеток эндотелия. ICAM-1 имеет особое значение, так как они опосредуют прочную адгезию к эндотелию и облегчают трансмиграцию лейкоцитов. Исследования показали, что существует положительная регуляция ICAM-1 как на синусоидальных клетках, так и на гепатоцитах, при воспалительных состояниях печени, таких как вирусная инфекция гепатитом В, аутоиммунные нарушения печени, алкогольный гепатит и отторжение трансплантата печени.

Таким образом, полипептиды AARS, которые модулируют продукцию молекул клеточной адгезии и клеточную адгезию к эндотелиальным клеткам, обладают потенциалом терапевтического применения при различных воспалительных заболеваниях, включая, например, сердечно-сосудистые заболевания, атеросклероз, аутоиммунные заболевания и легочную гипертензию.

Методы. Клетки пуповинной вены человека (ATCC, Кат. № CRL-2873) (HUVEC) высевали в концентрации примерно $1,2 \times 10^5$ клеток/на лунку в 12-луночные планшеты, покрытые раствором человеческого фибронектина для прикрепления клеток в предложенной ATCC среде с добавками и выращивали в соответствии с инструкциями производителя. Клетки стимулировали полипептидами AARS в указанных концентрациях или только ФСБ и инкубировали в течение ночи в ростовой среде. Клетки острого моноцитарного лейкоза человека (THP-1 (TIB-202)) ресуспендировали в 0,1% БСА/ бессывороточной среде RPMI с кальцием AM (6 мкл/мл; Invitrogen Кат. № C1430) и инкубировали в течение 30 мин. Меченые клетки собирали и ресуспендировали в среде RPMI, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, и плотность доводили до 2×10^6 клеток/мл.

100 мкл (2×10^5) меченных THP-1 клеток помещали в каждую лунку монослоя HUVEC в 1 мл росто-

вой среды и инкубировали в течение 15 мин. Лунки промывали дважды ФСБ для удаления несвязанных клеток и затем клетки анализировали с помощью флуоресцентного спектрофотометра для прочтения планшетов при длине волны возбуждения 488 нм и длине волны испускания 530 нм.

Дифференцировка клеток (Анализ G1-G4 в таблицах, данных ниже)

Дифференцировка и пролиферация адипоцитов в первичных пре-адипоцитах человека.

Уровень техники и терапевтическое значение:

Ожирение и липодистрофия обычно связаны с патологиями, включающими диабет и сердечно-сосудистые заболевания. На сегодняшний день признано, что жировая ткань представляет собой эндокринный орган, который секретирует множество различных факторов, и нарушенная регуляция секреции влияет на адипогенез, а также на гомеостаз глюкозы/инсулин во всем организме. Избыток жировой ткани, ведущий к ожирению, стал серьезной угрозой общественному здоровью. На развитие жировой ткани может влиять генетический фон, гормональный баланс, диета и физическая активность. Масса жировой ткани повышается, когда жировые клетки увеличиваются в размере из-за повышенного накопления триацилглицеринов. Кроме того, повышение количества жировых клеток, возникающих путем дифференцировки клеток-предшественников в адипоциты, также может происходить даже у взрослых организмов, что наблюдается при тяжелом ожирении человека и у крыс, которых содержат на рационе с высоким содержанием углеводов или жиров. Считается, в частности, что адипоциты возникают из мезенхимальных клеток, которые претерпевают процесс коммитирования и дифференцировки, адипогенеза. Клеточные линии пре-адипоцитов могут дифференцироваться в адипоциты при обработке адипогенными агентами, состоящими из синтетического глюкокортикоида, дексаметазона (DEX), изобутилметилксантина (IBMX) и инсулина, которые оценивались в указанных исследованиях. Было доказано, что активируемый пролифератором пероксисом рецептор γ (PPAR γ) и связывающийся с энхансером ССАТ белок (C/EBP) семейства факторов транскрипции играет основную роль в дифференцировке адипоцитов. На ранних этапах дифференцировки адипоцитов C/EBP β и C/EBP δ индуцируются DEX и IBMX, соответственно, которые затем вместе индуцируют PPAR γ и C/EBP α для активации различных маркеров адипоцитов, которые требуются для их функционирования.

Также было описано, что другие факторы транскрипции отрицательно или положительно регулируют адипогенез, и различные факторы роста и гормоны могут влиять на дифференцировку адипоцитов путем регулирования экспрессии адипогенными транскрипционными факторами. Таким образом, помимо того, что жировая ткань является основным депо энергии у млекопитающих благодаря запасанию триацилглицеринов и высвобождению жирных кислот в необходимое время, жировая ткань секретирует широкий набор молекул, которые вовлечены в различные физиологические процессы, включая иммунный ответ, функцию сосудов и энергетический гомеостаз. Цитокины, такие как ФНО- α и IL-6, секретируются из адипоцитов. Некоторые из указанных факторов также могут влиять на рост и развитие жировой ткани путем аутокринного/паракринного действия.

Таким образом, полипептиды AARS, обладающие способностью модулировать дифференцировку и/или пролиферацию нормальных пре-адипоцитов человека, обладают потенциалом терапевтического применения при широком диапазоне заболеваний, включая, например, лечение и предотвращение метаболических заболеваний, сердечно-сосудистых заболеваний, ожирения и липодистрофии, также как и длительных осложнений диабета.

Методы. Клетки HPAAd (пре-адипоциты человека) (Cell Application Кат. № 803sD) содержали в соответствии с рекомендациями поставщика. Для культивирования клетки быстро размораживали и сразу переносили в 15 мл ростовой среды для адипоцитов (Cell Application Кат. № 811M-250) и высевали в стандартный стерильный флакон с обработанной для тканевых культур поверхностью. Среду заменяли на свежую ростовую среду для адипоцитов каждые вторые сутки до достижения клетками >60% моно-слоя. Клетки выращивали при 37°C, 5% CO₂, в увлажненной среде и работали с ними в вытяжных шкафах с ламинарным потоком воздуха 2 класса биозащиты BSL2 с использованием стерильных методов и соответствующими средствами индивидуальной защиты, включая очки, перчатки и лабораторные халаты. Клетки высевали для дифференцировки на 96-луночные аналитические планшеты с прозрачным дном и черными стенками, обработанными для оптимального прикрепления тканевых культур, в концентрации примерно 50000 клеток/мл. Полипептиды AARS в конечной концентрации 250 нМ на лунку (или как специально указано в приведенных ниже примерах) добавляли в каждую аналитическую лунку. Все клетки поддерживали в ростовой среде в течение 2 дней, за исключением положительных контролей, которые стимулировали средой для адипогенной дифференцировки (Cell Applications Кат. № 811D-250). Клетки подвергали воздействию полипептидов AARS в течение 48 ч. Молекулы клеточной адгезии, включая растворимые VCAM и/или ICAM, измеряли с использованием стандартного набора ELISA из RND Systems (Кат. № DY643 и DY720 соответственно). Пролиферацию оценивали с помощью резазурина, как описано ранее, путем добавления свежей среды, содержащей резазурин, в планшеты после удаления супернатанта и инкубирования в течение трех часов при 37°C. Планшеты анализировали с помощью флуоресцентного спектрофотометра для прочтения планшетов и выживаемость/пролиферацию выражали как функцию связанной с резорифином флуоресценции обработанных полипептидом AARS лунок, де-

ленную на связанную с резорудином флуоресценцию лунок, обработанных только ФСБ. Добавляли свежую среду и дифференцировку поддерживали в течение 16 дней после изначальной смены среды, при этом смену среды проводили каждые вторые сутки для поддержания клеток в здоровом состоянии. На 15 день клетки помещали в свободную от сыворотки среду. На 16 день, дифференцировку в зрелые адипоциты оценивали с помощью окраски Nile Red (Invitrogen, конечная концентрация 3 мкМ) и подсчитывали с помощью флуоресцентного спектрофотометра для прочтения планшетов при соответствующих длинах волн. Для проведения указанного анализа клетки фиксировали 10% параформальдегидом, промывали в ФСБ и пермеабелизировали с помощью ФСБ, содержащим 0,5% БСА и 0,1% Тритон X-100. Пролиферацию клеток оценивали с помощью измерения интенсивности на флуоресцентном спектрофотометре при использовании красителя Hoechst 33432 в конечной концентрации 1 мкг/мл, как описано ранее. Адипогенез выражали как интенсивность сигнала Nile Red. Сигнал красителя Hoechst использовали для оценки количества клеток.

Дифференцировка и пролиферация клеток скелетной мускулатуры человека

Уровень техники и терапевтическое значение. Развитие скелетной мускулатуры представляет собой многоэтапный процесс, который вовлекает детерминирование плюрипотентных мезодермальных клеток, дающих начало миобластам, выведение миобластов из клеточного цикла и дифференцировку в мышечные клетки и, в конечном итоге, рост и созревание скелетно-мышечных волокон. Скелетно-мышечная дифференцировка включает выравнивание миобластов, удлинение и слияние в многоядерные мышечные трубочки, вместе с индукцией регуляторных и структурных специфичных генов мышц. На молекулярном уровне миогенное коммитирование и уровень экспрессии специфичных мышечных генов вовлекает специфичные скелетно-мышечные белки семейства MyoD, содержащие домен "спираль-петля-спираль" (helix-loop-helix, bHLH), которые включают MyoD, миогенин, myf-5 и MRF4 и фактор связывания энхансера миоцитов 2 (MEF2). Активность связывания ДНК белками семейства MyoD ослабляется Id, который формирует комплексы с продуктами гена E2a в пролиферирующих клетках и подавляется при индукции их дифференцировки. На запуск дифференцировки в мышечные трубочки отрицательно влияют некоторые факторы. Обработки миобластов эмбриональной бычьей сывороткой, основными факторами роста фибробластов 2 или трансформирующим фактором роста $\beta 1$, как известно, подавляют дифференцировку миобластов. Миогенез также отрицательно регулируется онкогенами, такими как c-myc, c-jun, c-fos, H-ras и E1a. Существует очень мало информации относительно сигнальных путей, которые запускаются в миобласте при удалении сыворотки, что приводит к индукции экспрессии гена семейства MyoD и мышечной дифференцировке. Оказывается, что миогенная дифференцировка зависит от активации интегринов, присутствующих на плазматической мембране миобластов, что указывает на функционирование биохимического пути "снаружи внутрь", в котором интегрин представляет собой более раннюю молекулярную частицу. Взаимодействия инсулиноподобных факторов роста (IGF)-I и -II с их рецепторами также являются положительными регуляторами скелетно-мышечной дифференцировки.

Соответственно, полипептиды AARS, обладающие способностью модулировать развитие мышц, обладают потенциалом терапевтического применения при широком диапазоне заболеваний, включая, например, лечение метаболических заболеваний, кахексии, различных состояний, связанных с мышечной атрофией, также как и заболеваний скелетной мускулатуры, где мышечная атрофия играет ключевую роль в патогенезе и симптоматологии. Человеческие клетки скелетной мускулатуры (HSkMC) могут дифференцироваться с появлением актомиозиновых миофиламентов. HSkMC использовались в исследовании генетических мышечных заболеваний, таких как злокачественная гипертермия. HSkMC также возможно использовать в качестве сердечного трансплантата, обеспечивающего восстановление поврежденной ткани сердца и, таким образом, полипептиды AARS, обладающие способностью модулировать развитие мышц, также применимы в качестве *in vitro* и *in vivo* регуляторов миогенеза.

Методы. Для оценки возможной роли полипептидов AARS в указанном процессе, использовали стандартный анализ дифференцировки клеток скелетной мускулатуры. Для указанного анализа клетки скелетной мускулатуры взрослого человека (HSkMC, Cell Application Кат. № 150-05f) изолировали из скелетных мышц конечностей здоровых доноров, представляющих собой людей. Клетки поддерживали в ростовой среде для HSkMC (Cell Applications, Кат. № 151-500). Указанные клетки можно культивировать и размножать в течение по меньшей мере 15 удвоений популяций. Для дифференцировки клетки поддерживали в ростовой среде в течение одного пассажа и затем высевали в концентрации 50000 клеток на мл среды в 96-луночные обработанные (ТС) планшеты с прозрачным дном и черными стенками, обработанные коллагеном в концентрации 100 мкл на лунку. Клеткам позволяли прикрепляться в течение ночи. Полипептиды AARS в ФСБ или только ФСБ добавляли в каждую лунку в конечной концентрации 250 нМ белка (или как специально указано в примерах ниже). В контрольные лунки наносили такой же объем среды для дифференцировки (Cell Applications Кат. № 151D-250) в это же время. Клетки инкубировали с белком или средой для дифференцировки в течение 48 ч. Через 48 ч супернатант клеточной культуры собирали из всех лунок и добавляли среду для дифференцировки в объеме 150 мкл на весь планшет, за исключением контрольных лунок, которые оставляли только в ростовой среде. Супернатант использовали для оценки продукции цитокинов, включая IL6 и IL8, как описано ранее. Пролиферацию оценивали с помощью резазурина, как описано ранее, путем добавления свежей среды, содержащей резазурин, в

планшеты после удаления супернатанта и инкубирования в течение трех часов при 37°C. За клетками наблюдали под микроскопом и смену среды на свежую среду для дифференцировки проводили каждые вторые сутки. На 10 день среду удаляли и клетки фиксировали 10% параформальдегидом в течение 30 мин. Клетки пермеабилizировали 0,1% Тритоном X-100 в ФСБ в течение 15 мин и окрашивали TR-меченным фаллоидином и красителем Hoechst 33432 (как описано ранее) для детектирования актина и ядер соответственно. Интенсивность окраски ядер использовали для определения пролиферации клеток в каждой лунке, и интенсивность окраски фаллоидином использовали для определения общего содержания актина. Клетки также окрашивали с помощью антител против скелетно-мышечного альфа-актина (Gen-Tex Кат. № GTX101362). Получали цифровые фотографии с использованием флуоресцентного микроскопа, а также проводили зрительное наблюдение и оценку всех лунок.

Дифференцировка и пролиферация мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека

Уровень техники и терапевтическое значение. Мезенхимальные стволовые клетки (MSC) являются мультипотентными стволовыми клетками, которые могут дифференцироваться в различные типы клеток, включая остеобласты, хондроциты, миоциты, адипоциты, бета-клетки островков поджелудочной железы и, возможно, нервные клетки. Многие различные события вносят вклад в коммитирование MSC в направлении других линий дифференцировки, включая координацию сложной сети транскрипционных факторов, кофакторов и сигнальных посредников многочисленных путей. MSC привлекают повышенный интерес с точки зрения терапевтического значения, так как они представляют собой популяцию клеток, имеющих потенциальную способность лечения широкого диапазона острых и дегенеративных заболеваний. Более того, полипептиды AARS, обладающие способностью модулировать дифференцировку MSC в различных направлениях развития, имеют высокий потенциал терапевтического применения для обеспечения *in vitro* или *in vivo* модуляции гематопоза, нейрогенеза, миогенеза, остеогенеза и адипогенеза, также как и в широком диапазоне нарушений и заболеваний, включая, например, воспалительные ответы, аутоиммунные заболевания, рак, нейрональную дегенерацию, мышечную дистрофию, остеопороз и липодистрофию. Человеческие MSC являются иммунологически привилегированными и представляют собой предпочтительный тип клеток для аллогенной трансплантации, обеспечивающих снижение риска отторжения и осложнений после трансплантации. Недавно также были получены значительные достижения в применении аутологичных мезенхимальных стволовых клеток для регенерации тканей человека, включая хрящ и мениск, связки и переломанную кость. Многие исследователи также изучали применение MSC для генной терапии, включая трансплантацию MSC, трансфицированных фактором роста сосудов эндотелия для улучшения функции сердца после инфаркта миокарда у крыс, использование MSC как носители для доставки интерферона- β в опухоли у мышей и генную терапию с помощью MSC, экспрессирующих BMP для обеспечения формирования кости. Соответственно, в связи с повышенным интересом к MSC как к прямым и модифицированным терапевтическим агентам, а также потенциальной способностью полипептидов AARS действовать в качестве терапевтических агентов для регуляции дифференцировки MSC *in vivo*, полипептиды AARS тестировали как потенциальные индукторы пролиферации и дифференцировки MSC.

Методы. hMSC (стромальные клетки костного мозга человека) (Cell Application Кат. № 492-05f) поддерживали в соответствии рекомендациями поставщика. Для культивирования клетки быстро размножали и сразу переносили в 15 мл ростовой среды для стромальных клеток костного мозга (Cell Application Кат. № 419-500) и высевали в стандартный стерильный флакон с обработанной для тканевых культур поверхностью. Среду заменяли на свежую ростовую среду для стромальных клеток костного мозга каждые вторые сутки до достижения клетками >60% монослоя. Клетки выращивали при 37°C, 5% CO₂, в увлажненной среде и работали с ними в вытяжных шкафах с ламинарным потоком воздуха 2 класса биозащиты, BSL2, с использованием стерильных методов и соответствующих средств индивидуальной защиты, включая очки, перчатки и лабораторные халаты. Клетки высевали в 96-луночные аналитические планшеты с прозрачным дном и черными стенками, обработанные для оптимального прикрепления тканевых культур, для дифференцировки в концентрации 50000 клеток/мл. Произшедшие из tPHK-синтетазы белки в конечной концентрации 250 нМ на лунку (или как специально указано в приведенных ниже примерах) добавляли в каждую аналитическую лунку. Все клетки поддерживали в ростовой среде в течение 2 дней, за исключением положительных контролей, которые стимулировали средой для остеогенной или хондрогенной дифференцировки (StemPro, Invitrogen, Кат. № A10072-01 и A10071-01 соответственно). Клетки подвергали воздействию полипептидов AARS в течение 48 ч. Растворимые молекулы VCAM измеряли с использованием стандартного набора для твердофазного ИФА фирмы RND Systems (Кат. № DY643). Пролиферацию оценивали с помощью резазурина, как описано ранее, путем добавления свежей среды, содержащей резазурин, в планшеты после удаления супернатанта и инкубирования в течение трех часов при 37°C. Планшеты анализировали с помощью флуоресцентного спектрофотометра для прочтения планшетов и выживаемость/пролиферацию выражали как функцию связанной с резоруфином флуоресценции обработанных полипептидом AARS лунок, деленную на связанную с резоруфином флуоресценцию лунок, обработанных только ФСБ. После оценки клеточной выживаемости, резазурин удаляли с двумя сменами среды и добавляли 0,5X среды для дифференцировки во все лунки. За дифференцировкой следили путем зрительного наблюдения всех лунок в течение 10 дней после смены

среды, при смене на свежую среду каждые вторые сутки для поддержания клеток в здоровом состоянии. Дифференцировку оценивали с помощью окраски на щелочную фосфатазу с использованием окраски ELF-97 (Invitrogen Cat# E6601) на 10 день после первой смены среды для дифференцировки. (Yang et al., Nature Protocols (6) 187-213 (2011) doi:10.1038/nprot.2010.189).

Пролиферация и дифференцировка гладкомышечных клеток легочной артерии человека (hPASC)

Уровень техники и терапевтическое значение. Гладкомышечные клетки легочной артерии (PASC) в нормальных кровеносных сосудах легкого взрослого человека являются наиболее неподвижными, не мигрирующими и они сильно коммитированы в направлении выполнения их сократительной функции в легких. Однако PASC являются не окончательно дифференцированными клетками и обладают способностью модулировать свой фенотип и выходить из состояния покоя в ответ на изменение локальных сигналов из окружающей среды. Указанное состояние дифференцировки может возникать в ходе развития, при повреждении ткани и ремоделировании сосудов в ответ на изменения в потребностях ткани. Легочная гипертензия (PH) связана с различными первичными состояниями, включая повышение легочного сопротивления периферических сосудов как результат повышения сосудистого тонуса и сократимости PASC и ремоделирования сосудов. Ремоделирование сосудов включает рост PASC, синтез материала матрикса и изменения во взаимодействиях клетка-клетка и клетка-матрикс в стенках малых легочных артерий (ПА), что приводит к повышенной толщине гладкомышечного компонента стенки сосудов и нарушенной мускуляризации в норме не мускуляризованных дистальных ПА. Указанный процесс вносит вклад в снижение диаметра просвета и повышение сопротивления периферических сосудов. Несмотря на то что конкретное участие PASC в изначальной индукции заболевания является неоднозначным, происходящие изменения играют ключевую роль в клинических последствиях заболевания. Решающим этапом в изучении дифференцировки клеток является идентификация набора специфичных для клеток или селективных для клеток генов, которые вносят вклад в функцию (функции) дифференцировки клеток. Были идентифицированы различные гены гладкомышечных клеток (SMC), которые служат в качестве применимых маркеров относительного состояния дифференцировки или созревания сосудистых SMC, такие как гены гладкомышечного альфа-актина, SM MHC, h1-кальпонина, SM22-альфа, десмина, метавинкулина, смутелина, и другие. Наиболее широко используемый маркер представляет собой гладкомышечный альфа-актин, частично из-за коммерческой доступности ряда очень высоко аффинных и высоко селективных антител для указанного белка. Вопрос, являются ли изменения в PASC результатом их собственных характеристик или дисрегуляции молекулярных событий, которые управляют ростом PASC, остается открытым. Однако понимание регуляторных сигналов и механизмов нарушения регуляции их возможностей имеет важное терапевтическое значение для лечения различных сосудистых и легочных заболеваний, включая легочную гипертензию, сосудистые заболевания.

Таким образом, полипептиды AARS, которые способны модулировать дифференцировку и/или пролиферацию нормальных человеческих клеток PASC, полученных от взрослого человека, обладают потенциалом терапевтического применения при различных сосудистых и легочных заболеваниях, включая воспалительные и обструктивные заболевания легких, включая, например, легочную гипертензию, хроническое обструктивное заболевание легких, идиопатический легочный фиброз и астму.

Методы. Клетки HPASC (Cell Applications Кат. № 352-05a) поддерживали в ростовой среде HPASC (Cell Applications Кат. № 352-05a) в 15 мл среды во флаконах на 125 мл в течение 1 пассажа до использования. Клетки поддерживали при 37°C, 5% CO₂, в увлажненной среде и работали с ними в вытяжных шкафах с ламинарным потоком воздуха 2 класса биозащиты, BSL2, с использованием стерильных методов и соответствующих средств индивидуальной защиты, включая очки, перчатки и лабораторные халаты. Клетки в объеме 80 мкл помещали на покрытые коллагеном планшеты на ночь в ростовой среде при плотности клеток 50000 клеток/мл. В каждую лунку добавляли полипептиды AARS в стерильном ФСБ в конечной концентрации 250 нМ (или как специально указано в приведенных ниже примерах). Контрольные лунки содержали только эквивалентный объем ФСБ. Образцы положительного контроля инкубировали в среде для дифференцировки HPASC, полученной от поставщика (Cell Applications Кат. № 311D-250). Клетки подвергали воздействию полипептидов AARS или ФСБ в основной среде (Cell Applications Кат. № 310-470) в течение 48 ч с последующей сменой среды на среду для дифференцировки во всем планшете. Супернатант собирали и использовали для оценки продукции цитокинов, включая IL6 и IL8, как описано ранее. Пролиферацию оценивали с помощью резазурина, как описано ранее, путем добавления свежей среды, содержащей резазурин, в планшеты после удаления супернатанта и инкубирования в течение 3 ч при 37°C. За клетками наблюдали в течение 10 дней при смене среды каждые вторые сутки. Дифференцировку оценивали после фиксации, как описано выше, и пермеабилзации с помощью 0,1% Тритона X-100, путем количественной оценки окраски на гладкомышечный альфа-актин с использованием анти-SMA-альфа антител (GeneTex Кат. № GTX101362) и Alexa 405-конъюгированных вторых антител. Пролиферацию оценивали с помощью окрашивания красителем Hoechst после фиксации клеток в 10% формальдегиде в течение 30 мин. Краситель Hoechst выявляли с использованием флуоресцентного спектрофотометра для прочтения дна планшетов при длине волны возбуждения (Ex) 405 нм и длине волны испускания (Em) 450 нм. Общую окраску на актин оценивали путем использования окрашивания Al-

еха-488-меченным фаллоидином (Invitrogen Cat# A12379).

Анализ связывания полипептидов AARS с клетками (анализы H1-H10 в таблицах, данных ниже)

Уровень техники и терапевтическое значение.

Связывание полипептидов AARS с конкретными типами клеток демонстрирует, что рассматриваемый тип клеток экспрессирует специфические рецепторы для рассматриваемого полипептида AARS. В зависимости от рассматриваемого типа клеток, клеточное связывание подразумевает потенциальную роль для полипептида AARS в регуляции активности или поведения клетки или подобных типов клеток, *in vivo*. Конкретные примеры указанных регуляторных ролей включают, например, связывание и модуляцию В-клеток и Т-клеток (иммуномодуляцию/хемотаксис/аутоиммунные заболевания/воспаления); клеток НерG2 (контроль метаболизма, захвата холестерина или метаболизма); клеток THP-1, Jurkat, Raji (иммуномодуляцию/хемотаксис/аутоиммунные заболевания/воспаления), тромбоцитов (тромбоцитопоз), адипоцитов 3T3L1 (липогенез/метаболизм) и мышечных миобластов C2C12 (миогенез, остеогенез).

Связывание с клетками крови

Методы. Кровь от здоровых доноров собирали в пробирки, содержащие ЭДТА. 2 мл цельной крови помещали в пробирку FACS на 5 мл (Falcon). Добавляли 2 мл буфера для окрашивания (ФСБ+2% эмбриональной бычьей сыворотки), перемешивали на вортексе в течение 3-5 секунд, центрифугировали в течение 5 мин при 300×g. Супернатант удаляли, повторяли промывку и осадок ресуспендировали в 2 мл буфера для окрашивания.

100 мкл отмытой крови переносили в чистые пробирки для образцов FACS на 5 мл. В пробирки добавляли His6- или V5-His6-меченные полипептиды AARS в концентрациях, указанных в конкретных экспериментах, описанных ниже, и инкубировали на льду в течение 45 мин. После инкубации в пробирки добавляли антитела к поверхностным маркерам различных типов клеток (BD Pharmigen Cat Nos. 560910, 555398, 555415, 340953, 560361) и FITC-меченные анти-V5-антитела (V5-FITC, Invitrogen Cat. № R96325) или FITC-меченные анти-His6-антитела (AbCam Cat. № ab1206), инкубировали в темноте на льду в течение 30 мин. После инкубации в пробирки добавляли 2 мл лизирующего раствора BD FACS (кат. №349202). Образцы перемешивали на вортексе и помещали на лед на 15 мин. Образцы промывали 1×2 мл ФСБ и ресуспендировали в 2 мл 2% формальдегида в ФСБ до проведения FACS-анализа. Полипептиды AARS, которые связывались более чем с 25% клеточной популяции, где антитело отдельно не имело значительного сигнала, считали "искомыми".

Анализ связывания тромбоцитов: 50 мкл отмытой крови переносили в чистые пробирки для образцов FACS на 5 мл, в пробирки добавляли His6- или V5-His6-меченные полипептиды AARS в концентрациях, указанных в конкретных экспериментах, описанных ниже, и пробирки помещали на лед на 45 мин. В каждую пробирку добавляли 20 мкл CD61-пан-антител к тромбоцитам (BD Pharmigen, Cat. № 555754) и 0,5 мкл анти-V5-FITC-меченных антител (Invitrogen, R96325) или меченных FITC анти-His6-антител (AbCam Cat. № ab1206). Пробирки помещали на лед в защищенном от света месте на 30 мин. Образцы доводили до общего объема 2 мл 1% формальдегидом в ФСБ и анализировали с помощью проточной цитометрии в течение 24 ч. Полипептиды AARS, которые связывались более чем с 25% клеточной популяции, где антитело отдельно не имело значительного сигнала, считали "целевыми".

Связывание с клетками в культуре. Приблизительно 1×10^6 клеток в 100 мкл полной среды RPMI помещали в пробирки FACS на 5 мл. His6- или V5-His6-меченные полипептиды AARS добавляли в пробирки в концентрациях, указанных в конкретных экспериментах, приведенных ниже, и указанные пробирки помещали на лед на 45 мин. Образцы клеток промывали дважды 1 мл буфера для окрашивания (ФСБ+2% эмбриональной бычьей сыворотки) и затем добавляли 0,5 мкл анти-V5-FITC антител (Invitrogen R96325) или меченных FITC анти-His6-антител (AbCam Cat. № ab1206) в буфере для окрашивания с 200 мкг/мл человеческого IgG и образцы инкубировали на льду в защищенном от света месте в течение 30 мин. Образцы промывали дважды 1 мл буфера для окрашивания и затем доводили до общего объема 2 мл 1% формальдегида в ФСБ и анализировали с помощью проточной цитометрии в пределах 24 ч. Полипептиды AARS, которые связывались более чем с 25% клеточной популяции, где антитело отдельно не имело значительного сигнала, считали "искомыми".

Исследования на животных: модуляция гематопоза и циркулирующих цитокинов

Уровень техники и терапевтическое значение. Гематопоз (В альтернативном варианте кроветворение или гемопоэз) представляет собой формирование клеточных компонентов крови. Все клеточные компоненты крови происходят из гематопозических стволовых клеток (HSC), которые находятся в срединной части кости (костном мозге) и имеют уникальную способность давать начало всем различным зрелым типам клеток крови. HSC являются самообновляющимися клетками: когда они пролиферируют по меньшей мере некоторые из их дочерних клеток сохраняются как HSC, таким образом, пул стволовых клеток не истощается. Каждая из других дочерних клеток HSC (миелоидные и лимфоидные клетки-предшественники), однако, может быть коммитирована в направлении любого из альтернативных путей дифференцировки, что приводит к появлению одного или более специфических типов клеток крови, но не может самообновляться. Изменение компонентов крови в ответ на воздействие полипептида AARS, таким образом, предполагает, что полипептид AARS способен модулировать гематопоз и регулировать

развитие стволовых клеток гемопоэза.

Все клетки крови можно разделить на три линии: эритроидные клетки, лимфоциты и миелоциты.

Эритроидные клетки представляют собой переносящие кислород эритроциты. Как ретикулоциты, так и эритроциты являются функциональными и высвобождаются в кровь. Соответственно, содержание ретикулоцитов оценивает скорость эритропоэза и изменение содержания эритроцитов предполагает, что полипептид AARS модулирует эритропоэз.

Лимфоциты являются основой приобретенной иммунной системы. Они происходят из общих лимфоидных предшественников.

Лимфоидный ряд в основном состоит из Т-клеток и В-клеток (типы лейкоцитов крови). Соответственно, изменения количества или состава лейкоцитов в ответ на подвержение воздействию полипептида AARS предполагает, что указанный полипептид AARS модулирует лимфопоэз.

Миелоциты, которые включают гранулоциты, мегакариоциты и макрофаги и происходят из общего миелоидных предшественников, вовлечены в различные процессы, включая врожденный иммунитет, приобретенный иммунитет и свертывание крови. Соответственно, изменения содержания или состава миелоидных клеток в ответ на воздействие полипептида AARS предполагает, что указанный полипептид AARS модулирует миелопоэз. Такое же обоснование может использоваться для определения того, модулируют ли полипептиды AARS гранулопоэз, путем измерения изменений количества гранулоцитов в ответ на воздействие полипептидов AARS. Роль полипептида AARS в модулировании мегакариопоэза можно прогнозировать на основании изменения состава или количества мегакариоцитов или тромбоцитов в крови.

Высвобождение цитокинов у мышей либо дикого типа, либо в различных системах животных моделей воспаления, обеспечивает изначальную оценку потенциальной способности полипептидов AARS модулировать воспалительные ответы. Роль полипептидов AARS в модулировании острых хронических воспалительных процессов, например, можно с легкостью оценить с использованием мышинной модели алиментарного ожирения (DIO). Модель DIO основана на переводе грызунов на рацион с высоким содержанием жиров в течение нескольких месяцев, что приводит к повышенному ожирению, устойчивости к инсулину и дисфункции иммунной системы. Конкретное последствие указанной дисрегуляции иммунной системы приводит к повышенной продукции провоспалительных цитокинов у животных, страдающих DIO, приводя к состоянию хронического системного воспаления. Увеличивается количество доказательств, указывающих на то, что слабо выраженное воспаление вносит вклад в развитие и поддержание ожирения и диабетического фенотипа, который подобным образом наблюдается при состоянии человека, называемом метаболическим синдромом. Таким образом, способность полипептидов AARS модулировать иммунную систему и восстанавливать гомеостатический баланс в сторону нормализации указанного хронического воспалительного состояния, может являться особо благоприятной при многих заболеваниях и нарушениях, включая, но не ограничиваясь перечисленными: лечение и предотвращение симптомов и побочных эффектов метаболических заболеваний, диабета, сердечно-сосудистых заболеваний, атеросклероза, ожирения, а также различных аутоиммунных заболеваний и нарушений, включая, например, рассеянный склероз, сосудистые и аллергические нарушения.

Методы. Самцов контрольных мышей дикого типа (C57BL/6) или мышей с алиментарным ожирением (C57BL/6NH std. откл.) получали из лаборатории Harlan (Индианаполис, Индиана) и держали по отдельности. Мышей DIO содержали на рационе с повышенным содержанием жиров (Cat. #TD, 06414-60% ккал из жира) и контрольных мышей содержали на нормальном рационе (Cat. #2018S-18% ккал из жира). Мышей DIO переводили на рацион с высоким содержанием жиров, начиная с 6-недельного возраста на период в общей сложности 10 недель. Мыши DIO и контрольные мыши имели неограниченный доступ к пище и воде. На 16-недельном возрасте мышей сортировали и случайным образом делили в группы по 5 животных на основе массы тела. На 2 день мышей взвешивали и собирали кровь из хвостовой вены (100 мкл) для предварительной обработки общего анализа крови (CBC). На 1 день мышей взвешивали и внутривенно инъецировали через хвостовую вену носитель (ФСБ) или отдельные полипептиды AARS в концентрации 10 мг/кг. Через 4 ч после инъекции у мышей собирали кровь из лицевой вены (150-200 мкл) для последующего анализа цитокинов. На 2, 3 и 4 день мышей внутривенно дозировали так же, как на 1 день. На 5 день мышей взвешивали, умерщвляли и собирали кровь посредством пункции сердца для общего анализа крови (CBC анализ) (плазма-ЭДТА) и оценки цитокинов (сыворотка).

Клинический анализ крови (общий анализ крови, CBC) и анализ цитокинов. Клинический анализ крови проводили на образцах крови, полученных до инъекций (день -2) и через 24 часа после последней инъекции (день 5). С помощью CBC оценивали общее содержание лейкоцитов крови и общую морфологию эритроцитов крови. Лейкоциты крови дополнительно охарактеризовывали по общему и относительному процентному содержанию нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов и базофилов. Анализ эритроцитов включал измерение гемоглобина (dL), гематокрита (%), средний объем эритроцитов (fL), среднее содержание гемоглобина в эритроците, среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (%) и общее количество тромбоцитов (10^3 /мкл). Анализ CBC проводили с помощью Antech Diagnostics (Fishers, IN).

Уровень циркулирующих цитокинов оценивали через 4 ч после инъекции (1 день) и через 24 ч по-

сле последней инъекции (5 день). Сыворотку выделяли, мгновенно замораживали и отправляли в центр Rules Based Medicine (Остин, Техас) для проведения множественного анализа. Образцы сыворотки анализировали с использованием панели RodentMap, включающей 59 уникальных биомаркеров, включая Apo A-1, CD40, CD40-L, CRP, ET-1, эотаксин, EGF, Фактор VII, фибриноген, FGF-9, FGF-основной, GST- α , GCP-2, GM-CSF, KC/GRO α , гаптоглобин, IgA, IFN γ , IP-10, IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IL-11, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, LIF, лимфотактин, M-CSF-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 γ , MIP-2, MIP-3 β , MDC, MMP-9, MCP-1, MCP-3, MCP-5, MPO, миоглобин, SAP, SGOT, SCF, RANTES, TPO, тканевой фактор, TIMP-1, TNF- α , VCAM-1, VEGF-A и vWF. Изменение уровня цитокинов считали "искомым", если цитокин повышался по меньшей мере в 2 раза или понижался по меньшей мере на 50% по сравнению с контролем носителя.

Пример 1.

Идентификация протеолитических фрагментов и продуктов альтернативного сплайсинга AARS с использованием платформ анализа топографии и миграции белка.

Для идентификации фрагментов AARS из клеточных линий, кондиционированной среды и тканей, образцы готовили следующим образом.

Мышиные макрофаги (RAW 264,7), цитозоль и кондиционированные среды: клетки обрабатывали бессывороточной средой DMEM в плотности 15×10^6 клеток/флакон. Через 48 ч кондиционированную среду и клеточные осадки собирали и обрабатывали. 200 мкг белка из секретированной и цитозольной протеомной фракции разделяли с помощью ПААГ-электрофореза в присутствии ДСН и готовили кусочки геля для анализа с помощью масс-спектрометрии.

Ткань поджелудочной железы мыши. Поджелудочную железу от трех мышей разрезали, гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса и обрабатывали ультразвуком в ФСБ с ингибиторами протеаз. Белки цитозоля выделяли путем центрифугирования и 200 мкг белка разделяли путем электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и готовили кусочки геля для анализа с помощью масс-спектрометрии.

Ткань печени мыши: печени трех мышей вырезали, гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса и обрабатывали ультразвуком в ФСБ с протеазными ингибиторами. Белки цитозоля выделяли посредством центрифугирования и 200 мкг белка разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и готовили кусочки геля для анализа с помощью масс-спектрометрии.

Гелевые гидролизаты анализировали с помощью масс-спектрометра с ионной ловушкой LTQ XL (ThermoFisher), снабженного собранной системой 3000 μ LC (Dionex). Образцы сначала наносили на Per-Trap (nichrom) в течение 10 мин с 5% ацетонитрилом в 0,1% муравьиной кислоте с использованием автоматического дозатора Dionex. Затем образцы анализировали с использованием капиллярной колонки из кварцевого стекла, 100 мкм (внутренний диаметр), содержащей 10 см смолы C18 (nichrom). Пептиды вымывали из колонки в масс-спектрометре при скорости тока 0,45 мкл/мин с использованием линейного градиента 5-33,5% ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте в пределах 110 мин.

LTQ работает в зависимом от данных режиме сканирования таким образом, что за одним полным MS сканом следует семь MS/MS сканов семи наиболее распространенных ионов. Динамическое исключение обеспечивается при числе повторов, равном 1, длительности повтора, равном 20 с, размер эксклюзивного списка составляет 300 и длительность эксклюзии составляет 60 с.

После анализа ЖХ/МС/МС, необработанные данные обрабатывали с помощью BioWorks3.3.1 (SEQUENT) с использованием составленного варианта базы данных реальных/ложных мышиных IPI. Данные SEQUEST фильтровали и сортировали с помощью программы DTASelect. В табл. 1, 4 и 7 показаны последовательности, идентифицированные указанным способом.

Пример 2.

Идентификация сплайс-вариантов с использованием глубокого секвенирования.

Сплайс-варианты аминоксил-тРНК-синтетазы идентифицировали с использованием высокоэффективного секвенирования библиотеки кДНК для транскриптов аминоксил-тРНК-синтетазы. Матрицы кДНК готовили из общих экстрактов РНК тканей, таких как мозг взрослого человека и эмбриона, и обогащенных аминоксил-тРНК-синтезатой транскриптов с использованием последовательностей праймеров, специфичных для всех отмеченных экзонов всех указанных человеческих аминоксил-тРНК-синтетаз и ассоциированных с ними белков.

Тотальную РНК человека получали из Clontech. Для образцов клеточной линии и ткани мыши, тотальную РНК экстрагировали с использованием набора для экстракции RNA Extract II (MN). Геномную ДНК расщепляли в образцах тотальной РНК с помощью ДНКазы I. Для получения зрелой матричной РНК (мРНК) образцы РНК обогащали дважды путем связывания полиА+ РНК и расщепления РНК без 5'-кэпа с помощью 5'-фосфат-зависимой экзонуклеазы. Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали из зрелой РНК с использованием праймеров, которые гибридизуются с последовательностями экзонов генов аминоксил-тРНК-синтетазы. Транскрипты, обогащенные генами аминоксил тРНК-синтетазы, амплифицировали с помощью мультимплексной ПЦР с использованием специфичной к экзону аминоксил-

тРНК-синтетазы кДНК и различных комбинаций праймеров экзонами аминоксил-тРНК-синтетазы.

Двухцепочечные транскриптомные продукты ПЦР, обогащенные аминоксил-тРНК-синтетазой, ферментативно восстанавливали по обоим концам перед добавлением А-"липкого конца" к 3'-концам восстановленных фрагментов. Затем добавляли адаптеры секвенирования и индексированные последовательности к транскриптомным продуктам ПЦР, обогащенным аминоксил-тРНК-синтетазой для получения библиотеки кДНК для глубокого секвенирования с использованием набора для мультиплексного секвенирования Illumina. Вкратце, транскриптомные продукты ПЦР, обогащенные аминоксил-тРНК-синтетазой с 3'-А "липкими концами" лигировали с адаптерными нуклеотидами InPE, предложенными в наборах. Индексированные последовательности добавляли к продуктам ПЦР с адаптерами InPE. Для получения достаточного количества фрагментов ДНК для глубокого секвенирования продукты ПЦР с индексированной последовательностью далее амплифицировали с помощью ПЦР. Обогащенную аминоксил-тРНК-синтетазой библиотеку кДНК с различными индексами объединяли и секвенировали с использованием ДНК-секвенатора Illumina для получения концевых "считываний", содержащих 50 пар оснований. "Считывания" (reads), полученные в результате секвенирования, картировали для генома человека или мыши для идентификации событий альтернативного сплайсинга. Программное обеспечение "SpliceMap" (общедоступное для скачивания на <http://www-stat.stanford.edu/~kinfai/SpliceMap/>) используется для идентификации границ сплайсинга.

Глубокое секвенирование указанной кДНК проводили для получения примерно 1 миллиона "считываний" секвенирования, состоящих примерно из 50 нуклеотидов в длину.

Последовательности, специфичные для экзонами аминоксил-тРНК-синтетазы, сравнивали с аннотированными экзонами соединений, и новые границы экзонами идентифицировали как варианты альтернативного сплайсинга.

Колонки в табл. 2, 5 и 8, обозначенные "5'-экзон" и "3'-экзон" указывают, какие экзонами (при их наличии) сливаются в последовательности кДНК. В табл. 2, 5 и 8 показаны последовательности, которые были идентифицированы как варианты альтернативного сплайсинга, транскрипты, содержащие указанные варианты сплайсинга, и полипептиды, экспрессированные указанными транскриптами. Варианты альтернативного сплайсинга, идентифицированные методом глубокого секвенирования, обозначены в табл. 2, 5 и 8, как варианты, для которых в колонках "считываний секвенирования" соответствует значение больше нуля, для мозга взрослого и эмбриона человека.

Пример 3.

Идентификация полипептидов AARS с использованием биоинформатики.

Белковые фрагменты AARS (резектины или аппендакрины) идентифицировали с использованием биоинформатических подходов. Аминокислотные последовательности полноразмерной человеческой аминоксил-тРНК-синтетазы выравнивали с полноразмерной аминокислотной последовательностью ее ортолога из бактерии *Escherichia coli* с использованием таких программ, как FASTA (доступна на сайте в интернете http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi) или программы BLASTP из NCBI (доступна на сайте в интернете http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_L_OC=blasthom). Последовательности резектина из человеческих белков идентифицировали как покрывающие участки последовательности при наличии при выравнивании пропусков в бактериальной последовательности или области с низкой гомологией между двумя видами. Указанные пептиды и соответствующие последовательности ДНК в табл. 3, 6 и 9 включают примеры, идентифицированные таким образом.

Пример 4.

Дифференциальная экспрессия полипептидов AARS, идентифицированных с помощью масс-спектрометрии.

Для сравнения дифференциальной экспрессии гистидил-тРНК-синтетазы в различных тканях/клеточных типах (последовательности и сравнения в табл. 1, 4 и 7) использовали технологию PROTOmap, как описано в примере 1: экспрессию резектина аминоксил-тРНК-синтетазы сравнивали между тканью мышечной печени и тканью мышечной поджелудочной железы. Экспрессию резектина аминоксил-тРНК-синтетазы сравнивали между цитозолем клеток RAW264,7 и кондиционированной средой от клеток RAW264,7, собранной через 48 ч после инкубации в бессывороточной среде.

Пример 5.

Дифференциальная экспрессия полипептидов AARS, идентифицированных путем глубокого секвенирования.

Для анализа дифференциальной экспрессии сплайс-вариантов проводили глубокое секвенирование для кДНК, полученных из различных тканей.

Экспрессия конкретных вариантов альтернативного сплайсинга аминоксил-тРНК-синтетазы является не ожидаемым явлением и указывает на биологическую важность. Различие относительного числа "считываний", наблюдаемых при глубоком секвенировании различных образцов транскриптома, указывает на то, что события альтернативного сплайсинга аминоксил-тРНК-синтетазы дифференциально регулируются и не являются просто артефактами, связанными с обработкой образца.

Пример 6.

Скрининг антител.

Для облегчения поиска антител, проявляющих предпочтительные связывания со специфическими фрагментами аминокислот-тРНК-синтетазы (например, повышенная в ≥ 10 раз аффинность по сравнению с исходным полноразмерным ферментом), проводили скрининг библиотеки фагового дисплея человеческих антител с помощью AbD Serotec (подразделение MORPHOSYS™, Martinsried/Planegg, Германия) с использованием методов аффинного обогащения ("пэннинга"). Антитела, после множества циклов скрининга обогащенные фрагментами аминокислот-тРНК-синтетазы, затем исследовали методом твердофазного иммуоферментного анализа на предмет реактивности с фрагментами и с исходным, полноразмерным ферментом. Клоны, демонстрирующие предпочтительное связывание (например, в ≥ 10 раз повышенную аффинность) с фрагментами аминокислот-тРНК-синтетазы, дополнительно охарактеризовывали.

Если необходимая специфичность не достигалась в конце процесса, использовали стратегии вычитания, такие как этапы предварительной абсорбции с полноразмерным ферментом и/или контрскрининга, для устранения перекрестно реагирующих антител, и запускали процесс селекции в отношении уникального эпитопа (эпитопов) на фрагментах аминокислот-тРНК-синтетазы.

Пример 7.

Идентификация сплайс-вариантов с использованием системной ПЦР.

Матрицы кДНК для реакций ПЦР были обратно транскрибированы из экстрактов тотальной РНК тканей или клеток (например, мозга человека, IMR-32 и HEK293T). Реакции ПЦР проводили с использованием специфических праймеров аминокислот-тРНК-синтетазы, с прямым праймером (FP1), сконструированным для гибридизации с 5'-нетранслируемым участком или экзонами в 5'-половине гена, и с обратным праймером (RP1), сконструированным для гибридизации с экзонами в 3'-половине гена или 3'UTR. Амплифицированные продукты ДНК анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле для идентификации продуктов ПЦР, которые отличаются по размеру от фрагментов, амплифицированных из традиционных транскриптов. Указанные различные продукты ПЦР вырезали и очищали из геля и лигировали в стандартный вектор клонирования для анализа последовательности ДНК. Варианты альтернативного сплайсинга идентифицировали как разные последовательности из традиционных транскриптов. Сплайс-варианты, идентифицированные с помощью указанного метода системной ПЦР, показаны в табл. 2, 5 и 8.

Пример 8.

Кодон-оптимизация выбранных полинуклеотидов AARS. Типичные полипептиды AARS (суммированные в табл. E2) выбраны для дальнейшего биохимического, биофизического и функционального анализа на основе одного или более из следующих критериев, i) идентификация протеолитических фрагментов полипептида AARS, ii) идентификация сплайс-вариантов полипептида AARS, iii) идентификация полипептидов AARS путем биоинформатического анализа, iv) доказательство дифференциальной экспрессии конкретных полипептидов AARS, v) доменная структура белка AARS, vi) размер полипептида AARS и vii) минимизация одинаковых дублирующихся последовательностей.

Таблица E2

Полипептиды AARS, выбранные для кодон-оптимизации и бактериальной экспрессии

| Название полипептида AARS | SEQ ID NO: для эпитопно меченных полипептидов AARS | SEQ ID NO: для полинуклеотидов AARS | Остатки белка AARS | Положение эпитопной метки | Используемый способ клонирования/синтеза |
|---------------------------|--|-------------------------------------|--------------------|---------------------------|--|
| HisRS1 ^{N1} | SEQ ID NO: 36 | SEQ ID NO: 44 | 1-141 | N-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{N1} | SEQ ID NO: 37 | SEQ ID NO: 44 | 1-141 | C-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{N2} | SEQ ID NO: 38 | SEQ ID NO: 45 | 1-408 | N-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{N2} | SEQ ID NO: 39 | SEQ ID NO: 45 | 1-408 | C-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{N3} | SEQ ID NO: 40 | SEQ ID NO: 46 | 1-113 | N-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{N3} | SEQ ID NO: 41 | SEQ ID NO: 46 | 1-113 | C-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{N5} | SEQ ID NO: 42 | SEQ ID NO: 47 | 1-243+27aa | N-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{N5} | SEQ ID NO: 43 | SEQ ID NO: 47 | 1-243+27aa | C-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{C1} | SEQ ID NO: 85 | SEQ ID NO: 101 | 405-509 | N-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{C1} | SEQ ID NO: 86 | SEQ ID NO: 101 | 405-509 | C-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{C2} | SEQ ID NO: 87 | SEQ ID NO: 102 | 1-60+175-509 | N-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{C2} | SEQ ID NO: 88 | SEQ ID NO: 102 | 1-60+175-509 | C-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{C3} | SEQ ID NO: 89 | SEQ ID NO: 103 | 1-60+211-509 | N-концевое | 2 |

| | | | | | |
|-----------------------|----------------|----------------|---------------|------------|---|
| HisRS1 ^{C3} | SEQ ID NO: 90 | SEQ ID NO: 103 | 1-60+211-509 | С-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{C4} | SEQ ID NO: 91 | SEQ ID NO: 104 | 1-100+211-509 | N-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{C4} | SEQ ID NO: 92 | SEQ ID NO: 104 | 1-100+211-509 | С-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{C5} | SEQ ID NO: 93 | SEQ ID NO: 105 | 1-174+211-509 | N-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{C5} | SEQ ID NO: 94 | SEQ ID NO: 105 | 1-174+211-509 | С-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{C6} | SEQ ID NO: 95 | SEQ ID NO: 106 | 1-60+101-509 | N-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{C6} | SEQ ID NO: 96 | SEQ ID NO: 106 | 1-60+101-509 | С-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{C7} | SEQ ID NO: 97 | SEQ ID NO: 107 | 1-100+175-509 | N-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{C7} | SEQ ID NO: 98 | SEQ ID NO: 107 | 1-100+175-509 | С-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{C10} | SEQ ID NO: 99 | SEQ ID NO: 108 | 369-509 | N-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{C10} | SEQ ID NO: 100 | SEQ ID NO: 108 | 369-509 | С-концевое | 2 |
| | | | | | |
| HisRS1 ^{I1} | SEQ ID NO: 111 | SEQ ID NO: 113 | 191-333 | N-концевое | 2 |
| HisRS1 ^{I1} | SEQ ID NO: 112 | SEQ ID NO: 113 | 191-333 | С-концевое | 2 |

Полинуклеотиды, кодирующие выбранные полипептиды AARS, перечисленные в табл. E2, наряду с соответствующей N-или С-концевой эпитопной меткой, синтезировали и клонировали, как описано в разделе Общих материалов и способов, с использованием метода синтеза генов, указанного в табл. E2.

Пример 9.

Низкопроизводительная бактериальная экспрессия и очистка. Полипептиды AARS, перечисленные в табл. E2, экспрессируются в *E.coli*, как описано в разделе общих материалов и способов. Относительная экспрессия растворимых и локализованных в тельцах включения полипептидов AARS суммирована в табл. E3.

Таблица E3
Суммарные характеристики бактериальной экспрессии полипептида AARS

| Полипептид AARS | Положение эпитопной метки | Количество белка, восстановленного из растворимой фракции | Количество белка, восстановленного из телец включения |
|----------------------|---------------------------------|---|---|
| HisRS1 ^{N1} | N-концевое | + | +++ |
| HisRS1 ^{N1} | С-концевое | + | + |
| HisRS1 ^{N2} | N-концевое | + | ++++ |
| HisRS1 ^{N2} | С-концевое | + | + |
| HisRS1 ^{N3} | N-концевое | + | +++ |
| HisRS1 ^{N3} | С-концевое | + | + |
| HisRS1 ^{N5} | N-концевое | + | ++ |
| HisRS1 ^{N5} | С-концевое | + | + |
| | | | |
| HisRS1 ^{C1} | N-концевое | + | +++ |
| HisRS1 ^{C1} | С-концевое | ++ | +++++ |
| HisRS1 ^{C2} | N-концевое | + | +++ |
| HisRS1 ^{C2} | С-концевое | + | + |
| HisRS1 ^{C3} | N-концевое | + | + |
| HisRS1 ^{C3} | С-концевое | + | + |

| | | | |
|-----------------------|------------|---|-----|
| HisRS1 ^{C4} | N-концевое | + | +++ |
| HisRS1 ^{C4} | C-концевое | + | + |
| HisRS1 ^{C5} | N-концевое | + | + |
| HisRS1 ^{C5} | C-концевое | + | + |
| HisRS1 ^{C6} | N-концевое | + | +++ |
| HisRS1 ^{C6} | C-концевое | + | + |
| HisRS1 ^{C7} | N-концевое | + | +++ |
| HisRS1 ^{C7} | C-концевое | + | + |
| HisRS1 ^{C10} | N-концевое | + | +++ |
| HisRS1 ^{C10} | C-концевое | + | + |
| | | | |
| HisRS1 ^{I1} | N-концевое | + | ++ |
| HisRS1 ^{I1} | C-концевое | + | + |

"+" обозначает экспрессию 0-1 мг/л полипептида AARS;

"++" обозначает экспрессию 1-5 мг/л полипептида AARS;

"+++" обозначает экспрессию 5-10 мг/л полипептида AARS;

"++++" обозначает экспрессию 10-15 мг/л полипептида AARS;

"+++++" обозначает экспрессию ≥ 15 мг/л полипептида AARS;

ND: не определено.

Неожиданным образом данные по экспрессии белка показали существование по меньшей мере одного семейства белковых доменов, для которых наблюдается высокий уровень экспрессии растворимого белка при экспрессии в *E.coli*. В частности, указанные данные демонстрируют, что HisRS1^{C1}, (аминокислоты 405-509) полипептидов AARS определяют границу первого нового белкового домена, который на высоком уровне экспрессируется в *E.coli*. Кроме того, большинство остальных белков может с легкостью экспрессироваться в тельцах включения для последующего повторной укладки.

Пример 10.

Крупномасштабная продукция полипептидов AARS.

Типичные полипептиды AARS получали в большем количестве для проведения дальнейшего функционального и биофизического исследования. Полипептиды AARS, перечисленные в табл. E4, экспрессировали в более масштабной культуре *E.coli*, как описано в разделе Общих материалов и способов. Выход и конкретные биофизические характеристики для каждого экспрессируемого растворимого белка суммированы ниже в табл. E4.

Таблица E4

Суммарные данные выхода и биофизической характеристики типичных полипептидов AARS

| AARS полипептид | Положение эпитопной метки | Выход [мг/л] ⁽¹⁾ | Чистота [%] | Эндотоксин [ЕЭ/мг] | Молекулярная масса | Рабочая исходная концентрация [мг/мл] | Стабильность [процентное восстановление] ⁽²⁾ | Агрегация [DLS] |
|----------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------|--------------------|----------------------|---------------------------------------|---|-----------------|
| HisRS1 ^{N1} | N-концевое | 9,3 | 80 | 1,0 | C: 18743 M: 18746 | 17,36 | 43 | +++++ |
| HisRS1 ^{N3} | N-концевое | 10,7 | 80 | 0,8 | C: 15499 M: 15501 | 19,48 | 80 | +++++ |
| HisRS1 ^{I1} | N-концевое | 6,2 | 90 | 2,1 | ND | 3,68 | ND | ND |
| HisRS1 ^{C1} | C-концевое | 32,2 | 95 | 0,3 | ND | 7,21 | ND | ND |
| HisRS1 ^{C1} | N-концевое | 8,2 | 95 | 0,9 | C: 14732 M: 29460 | 11,26 | 65 | +++++ |

⁽¹⁾ Выход, определенный путем измерения восстановления белка после последнего этапа очистки.

⁽²⁾ Определена как процентное восстановление не агрегированного материала через 1 неделю при 25°C.

⁽⁴⁾ Вероятно, представляет собой MW без N-концевого метионина.

C: Рассчитано.

M: Определенная молекулярная масса (массы).

Обозначения:

"+" обозначает менее 1% высокомолекулярных белковых агрегатов;

"++" обозначает менее 2% высокомолекулярных белковых агрегатов;

"+++" обозначает менее 5% высокомолекулярных белковых агрегатов;

"++++" обозначает менее 10% высокомолекулярных белковых агрегатов;

"+++++" обозначает более 10% высокомолекулярных белковых агрегатов;

ND: не определено.

Результаты указанных исследований показали, что типичные белки AARS из семейств белков

AARS HisRS1^{N1}, HisRS1^{N3}, HisRS1^{II} и HisRS1^{C1} имеют приемлемый изначальный уровень белковой экспрессии и характеристики растворимости.

Пример 11.

Анализ транскрипции типичных полипептидов AARS. Для тестирования способности полипептидов AARS модулировать экспрессию генов, выбранные полипептиды AARS инкубировали с мезенхимальными стволовыми клетками или человеческими клетками скелетной мускулатуры в течение времени и в концентрации, показанными в табл. E5.

Таблица E5

Анализ уровня транскрипции типичных полипептидов AARS в мезенхимальных стволовых клетках (MSC) или человеческих скелетно-мышечных клетках (HskMC)

| Описание исследуемого образца | | Тип клеток и время воздействия | | | | |
|---|---------------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| Полипептиды AARS | Положение эпитопной метки | Концентрация, нМ | MSC 24 часа | MSC 72 часа | HskMC 24 часа | HskMC 72 часа |
| HisRS1 ^{N1} | N-концевое | 250 | 4 | 2 | 7 | 4 |
| HisRS1 ^{N2} | N-концевое | 250 | >20 | 1 | 5 | 7 |
| HisRS1 ^{N3} | N-концевое | 250 | 6 | 6 | 5 | 5 |
| HisRS1 ^{N4} | C-концевое | 250 | >20 | 5 | 11 | 2 |
| HisRS1 ^{N5} | N-концевое | 250 | >20 | 3 | 4 | 2 |
| | | | | | | |
| HisRS1 ^{C1} | N-концевое | 250 | 0 | 1 | 5 | 7 |
| HisRS1 ^{C1} | C-концевое | 250 | 0 | 1 | 18 | 5 |
| HisRS1 ^{C2} | N-концевое | 250 | 16 | 0 | 5 | 6 |
| HisRS1 ^{C4} | N-концевое | 250 | 12 | 1 | 10 | 4 |
| HisRS1 ^{C6} | N-концевое | 250 | >20 | 0 | 3 | 4 |
| HisRS1 ^{C7} | N-концевое | 250 | 15 | 4 | 5 | 4 |
| HisRS1 ^{C8} | C-концевое | 250 | 18 | 0 | 7 | 5 |
| HisRS1 ^{C9} | C-концевое | 250 | 19 | 0 | 1 | 3 |
| HisRS1 ^{C10} | N-концевое | 250 | 13 | 3 | 12 | 2 |
| | | | | | | |
| HisRS1 ^{I1} | N-концевое | 250 | 0 | 0 | 5 | 4 |
| | | | | | | |
| Контроли | | | | | | |
| Среднее для всех подверженных скринингу полипептидов AARS | | | 6 | 2 | 5 | 4 |
| Смесь для остеогенеза | | | 16 | 18 | NA | NA |
| Смесь для хондрогенеза | | | 11 | 16 | NA | NA |
| Смесь для адипогенеза | | | 11 | 11 | NA | NA |
| SKMC, положительный контроль | | | NA | NA | 32 | 20 |
| Необработанные | | | 0 | 0 | 8 | 3 |

В табл. E5 значения в каждой колонке обозначают число генов, активность которых была модулирована, положительно или отрицательно по меньшей мере в 4 раза по сравнению с контрольными образцами, как описано в разделе общих способов. Данные показывают, что конкретные формы исследуемых полипептидов AARS имеют непредвиденную способность регулировать транскрипцию и, таким образом, потенциально могут модулировать направление развития или состояние дифференцировки при их добавлении к мезенхимальным стволовым клеткам (MSC) и/или человеческим скелетно-мышечным клеткам (HskMC). Закрашенные ячейки с изолированными жирным шрифтом номерами в таблице представляют собой примеры, где полипептид AARS оказывает значительное влияние на регуляцию транскрипции генов в клеточных линиях, с такой кратностью, как указано в таблице.

Был сделан вывод, что HisRS1^{N1}, HisRS1^{N2}, HisRS1^{N3}, HisRS1^{N4}, HisRS1^{N5}, HisRS1^{II}, HisRS1^{C1}, HisRS1^{C2}, HisRS1^{C4}, HisRS1^{C6}, HisRS1^{C7}, HisRS1^{C8}, HisRS1^{C9} и HisRS1^{C10}, являются важными регуляторами экспрессии генов мезенхимальных стволовых клеток и/или человеческих клеток скелетной мускулатуры.

Пример 12.

Функциональный анализ полипептидов AARS.

Для анализа способности полипептидов AARS модулировать ряд фенотипических процессов, выбранные полипептиды AARS инкубировали с клеточными типами и при условиях, представленных в разделе общих способов и табл. E5 и E6.

Таблица E6

Принципы анализов и критерии для детектирования "искомого" соединения

| Анализы пролиферации | |
|--|---------------|
| Источник и тип клеток | Номер анализа |
| Клетки мегакариоцитарного лейкоза человека/Mo7e | A1 |
| Клетки острого промиелоцитарного лейкоза человека/HL60 | A2 |
| Клетки лимфобласта человека (раковая клеточная линия)/RPMI8226 | A3 |
| Мезенхимальные стволовые клетки человека/hMSC | A4 |
| Астроциты человека | A5 |
| Клетки острого моноцитарного лейкоза человека/THP1 | A6 |
| Клетки аспирата костного мозга человека/клетки костного мозга (долговременная культура) | A7 |
| Синовиоциты человека/HFLS-SynRA | A8 |
| Пре-адипоциты человека/hPAD | A9 |
| Гладкомышечные клетки легочной артерии человека/hPASMC | A10 |
| Клетки скелетной мускулатуры человека/hSKMC | A11 |
| Анализ данных анализов пролиферации проводили путем деления числового значения для аналитической лунки на среднее значение для лунок, содержащих ФСБ, для аналитического планшета. Полипептиды AARS считали стимуляторами пролиферации, если измеренное значение более чем на 3 SD отличалось от значения для ФСБ в положительном направлении. Произшедший из ТРНК-синтетазы полипептид AARS считали цитотоксичным, если наблюдали отличие более чем на 3 SD от значения для ФСБ в отрицательном направлении. Цитотоксические соединения использовали в качестве отрицательного контроля и среднее значение для указанного соединения всегда больше чем на 3 SD отличалось от среднего значения для ФСБ. | |
| Анализы дифференцировки клеток и фенотипа | |
| Описание анализа | Номер анализа |
| Захват ацетилованного ЛПНП гепатоцитами человека (клетками HepG2C3a) | B1 |
| Анализ данных анализа захвата Ас-ЛПНП осуществляли путем деления числового значения для аналитической лунки на среднее значение для лунок, содержащих ФСБ, для аналитического планшета. Полипептиды AARS считали модуляторами захвата Ас-ЛПНП, если измеренное значение более чем на 2 SD отличалось от значения для ФСБ в положительном или отрицательном направлении. Визуальный контроль для подтверждения результатов, полученных с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов, осуществляли с использованием флуоресцентного микроскопа. | |
| Анализы нейтрофилов человека | |
| Описание анализа | Номер анализа |
| «Кислородный взрыв» нейтрофилов (агонист) | C1 |
| «Кислородный взрыв» нейтрофилов (антагонист) | C2 |
| Эластаза нейтрофилов | C3 |
| Анализ данных анализа нейтрофилов осуществляли путем деления числового значения для аналитической лунки на среднее значение для лунок, содержащих ФСБ, для аналитического планшета. Полипептиды AARS считали модуляторами продукции эластазы нейтрофилами или биологии окислительного взрыва, если измеренное значение более чем на 2 SD отличалось от значения для ФСБ в положительном или отрицательном направлении. | |
| Модуляцию Toll-подобных рецепторов (TLR) | |
| Описание анализа | Номер анализа |
| Активация TLR в клетках RAW BLUE | D1 |
| Антагонизм в отношении TLR в клетках RAW BLUE | D2 |
| Активация hTLR2 | D3 |

| | |
|--|---------------|
| Активация hTLR4 | D4 |
| Анализ данных для анализов модуляции TLR осуществляли путем деления числового значения для аналитической лунки на среднее значение для лунок, содержащих ФСБ, для аналитического планшета. Полипептиды AARS считали модуляторами специфической биологии TLR, если измеренное значения более чем на 3 SD отличалось от значения для ФСБ в положительном или отрицательном направлении. Положительные контроли, включая LPS и выявляющий реагент, всегда имели значительное отличие и на >3 SD отличались от среднего значения для ФСБ. | |
| Высвобождение цитокинов | |
| Описание анализа | Номер анализа |
| Продукция цитокинов синовиоцитами человека (высвобождение IL6) | E1 |
| Продукция цитокинов гладкомышечными клетками легочной артерии человека (hPASC) (высвобождение IL6) | E2 |
| Продукция цитокинов клетками скелетной мускулатуры человека (hSKMC) (высвобождение IL6) | E3 |
| Продукция цитокинов астроцитами человека (высвобождение IL6) | E4 |
| Общее высвобождение IL6 из крови | E5 |
| Продукция цитокинов (высвобождение IL8) гладкомышечными клетками легочной артерии человека (hPASC), инкубация в течение 72 часов | E6 |
| Продукция IL8 | |
| Описание анализа | Номер анализа |
| Продукция цитокинов синовиоцитами человека (высвобождение IL8) | E7 |
| Продукция цитокинов гладкомышечными клетками легочной артерии человека/hPASC (высвобождение IL8) | E8 |
| Продукция цитокинов клетками скелетной мускулатуры человека (hSKMC) (высвобождение IL8) | E9 |
| Продукция цитокинов астроцитами человека (высвобождение IL8) | E10 |
| Гепатоциты (HepG2C3a) (HepG2C3a) (высвобождение IL8) | E11 |
| Клетки острого промиелоцитарного лейкоза человека/HL60 (высвобождение IL8) | E12 |
| Лимфобластные клетки человека/RPMI8226 (высвобождение IL8) | E13 |
| Продукция TNF-альфа | |
| Гепатоциты человека/клетки HepG2C3a (высвобождение TNF-альфа) | E14 |
| Клетки острого моноцитарного лейкоза человека (раковая клеточная линия)/THP1 (высвобождение TNF-альфа) | E15 |
| Высвобождение IL10 | |
| Высвобождение IL10 из клеток острого промиелоцитарного лейкоза человека/HL60 | E16 |
| Первичные мононуклеары крови человека (высвобождение IL10) | E17 |
| Анализ данных анализов высвобождения цитокинов осуществляли путем деления числового значения для аналитической лунки на среднее значение для лунок, содержащих ФСБ, для аналитического планшета. Полипептиды AARS считали модуляторами продукции цитокинов или связанной с цитокинами биологии, если измеренное значение больше, чем 2 SD отличалось от значения для ФСБ в положительном или отрицательном направлении. Проводили анализ белкового стандарта (конкретного для каждого набора анализа) на каждом планшете для подтверждения хорошего качества анализа. Только анализы, кривые белковых стандартов для которых имели значение $R^2 > 0,9$, были выбраны для анализа данных. | |
| Адгезия клеток и хемотаксис | |
| Описание анализа | Номер анализа |
| Адгезия клеток моноцитов THP 1/эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) | F1 |

| | |
|---|---------------|
| Гепатоциты человека (HepG2C3a клеток) (высвобождение ICAM) | F2 |
| Регуляция клеточной адгезии клеток эндотелия микрососудов легкого человека (HLMVEC) (высвобождение ICAM) | F3 |
| Регуляция клеточной адгезии клеток эндотелия пупочной вены человека (HUVEC) (высвобождение VCAM) | F4 |
| Регуляция клеточной адгезии мезенхимальных стволовых клеток человека (hMSC) (высвобождение ICAM) | F5 |
| Регуляция клеточной адгезии клеток скелетной мускулатуры (HUVEC) (высвобождение ICAM) | F6 |
| Регуляция клеточной адгезии гладкомышечных клеток легочной артерии человека (hSKMC) (высвобождение VCAM) | F7 |
| Анализ данных анализа регуляции клеточной адгезии осуществляли путем деления числового значения для аналитической лунки на среднее значение для лунок, содержащих ФСБ, для аналитического планшета. Полипептиды AARS считали модуляторами клеточной адгезии или регуляторами биологии, связанной с клеточной адгезией, если получали значение, более чем на 2 SD отличное от значения для ФСБ, в положительном или отрицательном направлении. В случае ELISA-анализов, проводили анализ белкового стандарта (конкретного для каждого набора анализа) на каждом планшете для подтверждения хорошего качества анализа. Только анализы кривые белковых стандартов для которых имели значение $R^2 >$ чем 0,9, были выбраны для анализа данных. | |
| Дифференцировка клеток | |
| Описание анализа | Номер анализа |
| Дифференцировка клеток пре-адипоцитов человека (hPAD) | G1 |
| Дифференцировка клеток скелетной мускулатуры человека (hSKMC) | G2 |
| Дифференцировка клеток мезенхимальных стволовых клеток человека (hMSC) | G3 |
| Дифференцировка гладкомышечных клеток легочной артерии человека (hPASMC) | G4 |
| Анализ данных анализа дифференцировки клеток осуществляли путем деления числового значения для аналитической лунки на среднее значение для лунок, содержащих ФСБ, для аналитического планшета. Анализы дифференцировки оценивали на основе флуоресцентной или колориметрической интенсивности конкретных антител, описанных в разделе способов. Полипептиды AARS считали модуляторами дифференцировки клеток, если значение интенсивности для специфического маркера дифференцировки более чем на 2 SD отличалось от значения для ФСБ в положительном или отрицательном направлении в конкретной обработанной лунке. | |
| Клеточное связывание | |
| Описание анализа | Номер анализа |
| PBMC | H1 |
| Первичные Т-клетки | H2 |
| Первичные В-клетки | H3 |
| Первичные моноциты | H4 |
| HepG2 | H5 |
| 3T3L1 | H6 |
| C2C12 | H7 |
| THP1 | H8 |
| Jurkat | H9 |
| Raji | H10 |
| Полипептиды AARS считали связанными с конкретным типом клеток, если средняя связанная с клетками интенсивность флуоресценции более, чем на 2 SD отличалась от контрольных значений для реагента для указанного типа клеток. | |

Таблица Е7

Результаты функционального анализа полипептидов AARS

| Полипептиды AARS | Положение эпитопной метки | Концентрация [нМ] | Критерии анализа |
|-----------------------|------------------------------|-------------------|--|
| HisRS1 ^{N1} | N-концевое | 250 | D1 (Биология Toll-подобного рецептора) E12, E14 (Высвобождение цитокинов) G1 (Клеточная дифференцировка) |
| HisRS1 ^{N2} | N-концевое | 250 | C2 (Нейтрофильный «кислородный взрыв») E1, E7, E13 (Высвобождение цитокинов) F2 (Клеточная адгезия и хемотаксис) |
| HisRS1 ^{N3} | N-концевое | 250 | A7 (Пролиферация) E1, E7 (Высвобождение цитокинов) F5, F6 (Клеточная адгезия и хемотаксис) G3 (Клеточная дифференцировка) |
| HisRS1 ^{N4} | C-концевое | 250 | A7 (Пролиферация) D1 (Биология Toll-подобного рецептора) |
| HisRS1 ^{N5} | N-концевое | 250 | C2 (Нейтрофильный «кислородный взрыв») D2 (Биология Toll-подобного рецептора) E7, E10, E11, E12 (Высвобождение цитокинов) F2, F6 (Клеточная адгезия и хемотаксис) G1 (Клеточная дифференцировка) |
| HisRS1 ^{C1} | N-концевое | 250 | F2 (Клеточная адгезия и хемотаксис) G1 (Клеточная дифференцировка) |
| HisRS1 ^{C1} | C-концевое | 250 | E1, E9, E11 (Высвобождение цитокинов) G1, G3 (Клеточная дифференцировка) |
| HisRS1 ^{C2} | N-концевое | 250 | D1 (Биология TLR-подобного рецептора) E11, E12, E14 (Высвобождение цитокинов) |
| HisRS1 ^{C4} | N-концевое | 250 | A6 (Пролиферация) B1 (Захват Ac-LDL) D1 (Биология Toll-подобного рецептора) E11, E12, E14 (Высвобождение цитокинов) G1, G2 (Клеточная дифференцировка) |
| HisRS1 ^{C6} | N-концевое | 250 | A3 (Пролиферация) C2 (Нейтрофильный «кислородный взрыв») D1, D2 (Биология TLR-подобного рецептора) F2 (Клеточная адгезия и хемотаксис) |
| HisRS1 ^{C7} | N-концевое | 250 | C2 (Нейтрофильный «кислородный взрыв») D1, D2 (Биология TLR-подобного рецептора) F2, F6 (Клеточная адгезия и хемотаксис) |
| HisRS1 ^{C8} | C-концевое | 250 | A4, A7 (Пролиферация) |
| | | | E11 (Высвобождение цитокинов) |
| HisRS1 ^{C9} | C-концевое | 250 | A4 (Пролиферация) B1 (Захват Ac-LDL) D1 (Биология TLR-подобного рецептора) E1, E8, E11, E12, E13 (Высвобождение цитокинов) F3, F6 (Клеточная адгезия и хемотаксис) G3 (Клеточная дифференцировка) |
| HisRS1 ^{C10} | N-концевое | 250 | E1 (Высвобождение цитокинов) |
| HisRS1 ^{I1} | N-концевое | 250 | D1 (Биология TLR-подобного рецептора) E12, E14 (Высвобождение цитокинов) G1 (Клеточная дифференцировка) |

Был сделан вывод, что HisRS1^{N1} (аминокислоты 1-141), HisRS1^{N2} (аминокислоты 1-408), HisRS1^{N3} (аминокислоты 1-113), HisRS1^{N4} (аминокислоты 1-60), HisRS1^{N5} (аминокислоты 1-244 + 26 aa), HisRS1^{I1} (аминокислоты 191-333), HisRS1^{C1} (аминокислоты 405-509), HisRS1^{O2} (аминокислоты 1-60 + 175-509), HisRS1^{O4} (аминокислоты 1-100+211-509), HisRS1^{O6} (аминокислоты 1-60+101-509), HisRS1^{O7} (аминокис-

лоты 1-100+175-509), HisRS1⁰⁸ (аминоксилоты 1-60+399-509), HisRS1⁰⁹ (аминоксилоты 1-100+399-509) и HisRS1¹⁰ (аминоксилоты 369-509) являются важными регуляторами пролиферации, дифференцировки, высвобождения цитокинов, активации нейтрофилов, клеточной адгезии и хемотаксиса. Следует отметить, что во многих случаях слитые по N- и C-концу белки имеют разные паттерны активности, как в экспериментах по анализу уровня транскрипции, так и в экспериментах фенотипического скрининга. Указанные данные соответствуют гипотезе, что новая биологическая активность полипептидов AARS подавляется, когда указанный полипептид AARS является частью интактной тРНК-синтетазы или в процессе трансляции сливается по любому концу с другим белком, но что указанная биологическая активность восстанавливается, когда полипептиды AARS имеют свободный амино- или карбокси-конец.

Соответственно, был сделан вывод, что полипептиды AARS, содержащие любые из аминокислотных последовательностей, перечисленных выше, определяют приблизительные границы (т.е. в пределах примерно ± 5 аминокислот) ряда новых высокоактивных доменов полипептида AARS, которые являются i) высокофункциональноактивным, ii) могут быть с легкостью сконструированы и продуцированы в *E. coli* и iii) проявляют благоприятные характеристики стабильности и агрегации белка.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> aTyr Pharma Inc.
Pangu Biopharma Limited
Greene, Leslie Ann
Chiang, Kyle P.
Hong, Fei
Vasserot, Alain P.
Lo, Wing-Sze
Watkins, Jeffry D.
Mendlein, John D.
Quinn, Cheryl L.

<120> ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ, ПОЛИПЕПТИД АМИНОАЦИЛ-ТРНК-СИНТЕТАЗЫ (AARS)

<130> 120161.450PC

<140> PCT

<141> 2011-07-12

<150> US 61/363,581

<151> 2010-07-12

<150> US 61/363,585

<151> 2010-07-12

<150> US 61/363,587

<151> 2010-07-12

<160> 113

<170> FastSEQ для Windows версии 4.0

<210> 1

<211> 77

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Олигонуклеотид

<400> 1

aggaggtaaa acatatgcat catcatcatc atcacggtaa gcctatccct aaccctttgc 60
tcggtctcga ttctacg 77

| | |
|--|----|
| <210> 2 | |
| <211> 12 | |
| <212> ДНК | |
| <213> Искусственная последовательность | |
| <220> | |
| <223> Олигонуклеотид | |
| <400> 2 | |
| taatgactcg ag | 12 |
| <210> 3 | |
| <211> 17 | |
| <212> ДНК | |
| <213> Искусственная последовательность | |
| <220> | |
| <223> Олигонуклеотид | |
| <400> 3 | |
| aggagataaaa acatatg | 17 |
| <210> 4 | |
| <211> 14 | |
| <212> ДНК | |
| <213> Искусственная последовательность | |
| <220> | |
| <223> Олигонуклеотид | |
| <400> 4 | |
| aggaggtaaaa acat | 14 |
| <210> 5 | |
| <211> 14 | |
| <212> ДНК | |
| <213> Искусственная последовательность | |
| <220> | |
| <223> Олигонуклеотид | |
| <400> 5 | |
| aggagataaaa acat | 14 |
| <210> 6 | |
| <211> 15 | |
| <212> ДНК | |
| <213> Искусственная последовательность | |
| <220> | |
| <223> Олигонуклеотид | |
| <400> 6 | |
| gaaggagata tacat | 15 |
| <210> 7 | |
| <211> 72 | |
| <212> ДНК | |
| <213> Искусственная последовательность | |
| <220> | |
| <223> Олигонуклеотид | |

<400> 7
 ggtaagccta tccctaaccc tctcctcggt ctgattcta cgcaccacca tcatcaccat 60
 taatgactcg ag 72

<210> 8
 <211> 72
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид

<400> 8
 catatgcata atcatcatca tcacggtaag cctatcccta accctctcct cggctctcgat 60
 tctacgggat cc 72

<210> 9
 <211> 12
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид

<400> 9
 ctcgagtaat ga 12

<210> 10
 <211> 12
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид

<400> 10
 catatgggat cc 12

<210> 11
 <211> 72
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид

<400> 11
 ctcgagggta agcctatccc taaccctctc ctgggtctcg attctacgca ccaccaccac 60
 caccactaat ga 72

<210> 12
 <211> 141
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
 20 25 30
 Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35 40 45
 Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp

| | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|
| 50 | | 55 | | 60 |
| Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile | | | | |
| 65 | | 70 | | 75 |
| Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val | | | | |
| | 85 | | 90 | |
| Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys | | | | |
| | 100 | | 105 | |
| Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg | | | | |
| | 115 | | 120 | |
| Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met | | | | |
| 130 | | 135 | | 140 |

<210> 13
 <211> 423
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
 ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
 ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
 ggcacaagag actatagtc cgggcagatg gcagttcgcg agaaggtgtt tgacgtaatc 240
 atccgttgct tcaagcgcca cgggtgcagaa gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag 300
 gaaacactga tgggaaagta tggggaagac tccaagctta tctatgacct gaaggaccag 360
 ggcgggggagc tcctgtccct tcgctatgac ctcactgttc cttttgctcg gtatttggca 420
 atg 423

<210> 14
 <211> 408
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
 20 25 30
 Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35 40 45
 Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
 50 55 60
 Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
 65 70 75 80
 Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
 85 90 95
 Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
 100 105 110
 Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
 115 120 125
 Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
 130 135 140
 Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
 145 150 155 160
 Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
 165 170 175
 Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
 180 185 190
 Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
 195 200 205
 Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys
 210 215 220
 Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys

225 230 235 240
 Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu
 245 250 255
 Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 260 265 270
 Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
 275 280 285
 Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 290 295 300
 Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335
 Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350
 Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu
 405

<210> 15

<211> 1224

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 15

atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
 ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
 ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
 ggcacaagag actatagtcc ccggcagatg gcagttcgcg agaaggtgtt tgacgtaatc 240
 atccgttgct tcaagcgcca cgggtgcagaa gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag 300
 gaaacactga tgggaaagta tggggaagac tccaagctta tctatgacct gaaggaccag 360
 ggcggggagc tcctgtccct tcgctatgac ctcaactgttc ctttttgctcg gtattttggca 420
 atgaataaac tgaccaacat taaacgctac cacatagcaa aggtatatcg gcgggataac 480
 ccagccatga cccgtggcgc ataccgggaa ttctaccagt gtgattttga cattgctggg 540
 aactttgatc ccatgatccc tgatgcagag tgccctgaaga tcatgtgcga gatcctgagt 600
 tcacttcaga taggcgactt cctggtcaag gtaaacgata gacgcattct agatgggatg 660
 tttgctatct gtggtgtttc tgacagcaag ttccgtacca tctgtcctc agtagacaag 720
 ctggacaagg tgtcctggga agaggtgaag aatgagatgg tgggagagaa gggccttgca 780
 cctgaggtgg ctgaccgcat tggggactat gtccagcaac atggtggggg atccctgggtg 840
 gaacagctgc tccaggatcc taaactatcc caaacaagc aggccttggg gggcctggga 900
 gacctgaagt tgctctttga gtacctgacc ctattttggca ttgatgacaa aatctccttt 960
 gacctgagcc ttgctcgagg gctggattac tacactgggg tgatctatga ggcagtgtctg 1020
 ctacagaccc cagcccaggc aggggaagag cccctgggtg tgggcagtgt ggctgctgga 1080
 ggacgctatg atgggctagt gggcatgttc gaccccaaag ggcgcaaggt gccatgtgtg 1140
 gggctcagca ttgggggtgga gcggattttc tccatcgtgg aacagagact agaggctttg 1200
 gaggagaaga tacggaccac ggag 1224

<210> 16

<211> 12

<212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 16

Ala Ser Ala Glu Gln Ile Glu Glu Glu Val Thr Lys
 1 5 10

<210> 17
 <211> 49
 <212> Белок
 <213> Mus musculus

<400> 17
 Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Gln Asp Glu Gly Lys Gln Lys
 1 5 10 15
 Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln
 20 25 30
 Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile Ile Arg Cys Phe Lys
 35 40 45
 Arg

<210> 18
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Mus musculus

<400> 18
 His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val Phe Glu Leu Lys
 1 5 10

<210> 19
 <211> 18
 <212> Белок
 <213> Mus musculus

<400> 19
 Glu Thr Leu Thr Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys Leu Ile Tyr Asp
 1 5 10 15
 Leu Lys

<210> 20
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Mus musculus

<400> 20
 Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
 1 5 10

<210> 21
 <211> 103
 <212> Белок
 <213> Mus musculus

<400> 21
 Ala Ser Ala Glu Gln Ile Glu Glu Glu Val Thr Lys Leu Leu Lys Leu
 1 5 10 15
 Lys Ala Gln Leu Gly Gln Asp Glu Gly Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys
 20 25 30
 Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg
 35 40 45
 Glu Lys Val Phe Asp Val Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala
 50 55 60
 Glu Val Ile Asp Thr Pro Val Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Thr Gly

030418

65 70 75 80
Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly
 85 90 95
Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
 100

```
<210> 22
<211> 14
<212> Белок
<213> Mus musculus
```

<400> 22
His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val Phe Glu Leu Lys
1 5 10

```
<210> 23
<211> 166
<212> Белок
<213> Mus musculus
```

[illegible]

```
<210> 24
<211> 22
<212> Белок
<213> Mus musculus
```

```
<400> 24
Ile Gly Asp Tyr Val Gln Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln
 1          5          10          15
Leu Leu Gln Asp Pro Lys
      20
```

```
<210> 25
<211> 202
<212> Белок
<213> Mus musculus
```

<400> 25

```

His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val Phe Glu Leu Lys Glu Thr
 1           5           10           15
Leu Thr Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys Leu Ile Tyr Asp Leu Lys
      20           25           30
Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg Tyr Asp Leu Thr Val Pro
      35           40           45
Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu Thr Asn Ile Lys Arg Tyr
      50           55           60
His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn Pro Ala Met Thr Arg Gly
      65           70           75           80
Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe Asp Ile Ala Gly Gln Phe
      85           90           95
Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu Lys Ile Met Cys Glu Ile
      100          105          110
Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asn Phe Leu Val Lys Val Asn Asp Arg
      115          120          125
Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Val Cys Gly Val Pro Asp Ser Lys
      130          135          140
Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val Ser Trp
      145          150          155          160
Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu Lys Gly Leu Ala Pro Glu
      165          170          175
Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln Gln His Gly Gly Val Ser
      180          185          190
Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
      195          200

```

<210> 26

<211> 60

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 26

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1           5           10           15
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
      20           25           30
Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
      35           40           45
Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys
      50           55           60

```

<210> 27

<211> 180

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 27

```

atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aaccccccaag 180

```

<210> 28

<211> 270

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 28

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1           5           10           15
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20           25           30
Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35           40           45
Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
          50           55           60
Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65           70           75           80
Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
          85           90           95
Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
          100          105          110
Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
          115          120          125
Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
          130          135          140
Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145          150          155          160
Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
          165          170          175
Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
          180          185          190
Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
          195          200          205
Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys
          210          215          220
Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys
225          230          235          240
Leu Asp Lys Val Gly Tyr Pro Trp Trp Asn Ser Cys Ser Arg Ile Leu
          245          250          255
Asn Tyr Pro Lys Thr Ser Arg Pro Trp Arg Ala Trp Glu Thr
          260          265          270

```

<210> 29

<211> 813

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 29

```

atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaage aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
ggcacaagag actatagtcc cgggcagatg gcagttcgcg agaaggtggt tgacgtaatc 240
atccgttgct tcaagcgcca cgggtgcagaa gtcattgata cacctgtatt tgaactaaaag 300
gaaacactga tgggaaagta tggggaagac tccaagctta tctatgacct gaaggaccag 360
ggcggggagc tcctgtccct tcgctatgac ctactgttc cttttgctcg gtatttggca 420
atgaataaac tgaccaacat taaacgctac cacatagcaa aggtatatcg gcgggataac 480
ccagccatga cccgtggccg ataccgggaa ttctaccagt gtgattttga cattgctggg 540
aactttgatc ccatgatccc tgatgcagag tgcoctgaaga tcatgtgcga gatcctgagt 600
tcacttcaga taggcgactt cctggtcaag gtaaacgata gacgcattct agatgggatg 660
tttgctatct gtggtgtttc tgacagcaag ttccgtacca tctgctcctc agtagacaag 720
ctggacaagg tggggtatcc ctggtggaac agctgctcca ggatcctaaa ctatcccaaa 780
acaagcaggc cttggagggc ctgggagacc tga 813

```

<210> 30

<211> 50

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 30
gaaatttggtg ctcaaaaccc ccaagtagag acgaggtttc accatggttg 50

<210> 31
<211> 8
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 31
Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys
1 5

<210> 32
<211> 50
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 32
ctcctcagta gacaagctgg acaaggtggg gtatccctgg tggaacagct 50

<210> 33
<211> 16
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 33
Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val Gly Tyr Pro Trp Trp Asn Ser
1 5 10 15

<210> 34
<211> 113
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 34
Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30
Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45
Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60
Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80
Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95
Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110
Leu

<210> 35
<211> 339
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 35
atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120


```

ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aaccccccaag 180
ggcacaagag actatagtcc cgggcagatg gcagttcgcg agaaggtggt tgacgtaatc 240
atccgttgct tcaagcgcca cgggtgcagaa gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag 300
gaaacactga tgggaaagta tggggaagac tccaagctt 339

```

<210> 36

<211> 165

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий
N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 36

```

Met His His His His His His Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu
 1          5          10          15
Gly Leu Asp Ser Thr Gly Ser Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu
          20          25          30
Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala
          35          40          45
Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys
          50          55          60
Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr
65          70          75          80
Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu
          85          90          95
Lys Val Phe Asp Val Ile Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu
          100          105          110
Val Ile Asp Thr Pro Val Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys
          115          120          125
Tyr Gly Glu Asp Ser Lys Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly
          130          135          140
Glu Leu Leu Ser Leu Arg Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr
145          150          155          160
Leu Ala Met Leu Glu
          165

```

<210> 37

<211> 165

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий
N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 37

```

Met Gly Ser Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln
 1          5          10          15
Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu
          20          25          30
Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly
          35          40          45
Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr
          50          55          60
Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp
65          70          75          80
Val Ile Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr
          85          90          95
Pro Val Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp
          100          105          110

```

```

Ser Lys Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser
   115                               120                               125
Leu Arg Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Leu
   130                               135                               140
Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr His
  145                               150                               155                               160
His His His His His
                               165

```

<210> 38

<211> 432

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий
N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 38

```

Met His His His His His His Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu
  1           5           10           15
Gly Leu Asp Ser Thr Gly Ser Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu
   20           25           30
Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Lys Ala
   35           40           45
Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys
   50           55           60
Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr
  65           70           75           80
Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu
   85           90           95
Lys Val Phe Asp Val Ile Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu
  100          105          110
Val Ile Asp Thr Pro Val Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys
  115          120          125
Tyr Gly Glu Asp Ser Lys Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly
  130          135          140
Glu Leu Leu Ser Leu Arg Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr
  145          150          155          160
Leu Ala Met Asn Lys Leu Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys
   165          170          175
Val Tyr Arg Arg Asp Asn Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu
  180          185          190
Phe Tyr Gln Cys Asp Phe Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile
  195          200          205
Pro Asp Ala Glu Cys Leu Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu
  210          215          220
Gln Ile Gly Asp Phe Leu Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp
  225          230          235          240
Gly Met Phe Ala Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile
   245          250          255
Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys
  260          265          270
Asn Glu Met Val Gly Glu Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg
  275          280          285
Ile Gly Asp Tyr Val Gln Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln
  290          295          300
Leu Leu Gln Asp Pro Lys Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly
  305          310          315          320
Leu Gly Asp Leu Lys Leu Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile
   325          330          335
Asp Asp Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr

```

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | |
| Tyr | Thr | Gly | Val | Ile | Tyr | Glu | Ala | Val | Leu | Leu | Gln | Thr | Pro | Ala | Gln | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | |
| Ala | Gly | Glu | Glu | Pro | Leu | Gly | Val | Gly | Ser | Val | Ala | Ala | Gly | Gly | Arg | |
| | | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |
| Tyr | Asp | Gly | Leu | Val | Gly | Met | Phe | Asp | Pro | Lys | Gly | Arg | Lys | Val | Pro | |
| 385 | | | | | 390 | | | | | | 395 | | | | 400 | |
| Cys | Val | Gly | Leu | Ser | Ile | Gly | Val | Glu | Arg | Ile | Phe | Ser | Ile | Val | Glu | |
| | | | | 405 | | | | | | 410 | | | | | 415 | |
| Gln | Arg | Leu | Glu | Ala | Leu | Glu | Glu | Lys | Ile | Arg | Thr | Thr | Glu | Leu | Glu | |
| 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | | | | |

<210> 39

 $\langle 211 \rangle$ 432

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий С-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 39

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|----------|-----|-----|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|-----------|------------|
| Met 1 | Gly | Ser | Ala | Glu 5 | Arg | Ala | Ala | Leu | Glu 10 | Glu | Leu | Val | Lys | Leu 15 | Gln |
| Gly | Glu | Arg | Val 20 | Arg | Gly | Leu | Lys | Gln 25 | Gln | Lys | Ala | Ser | Ala 30 | Glu | Leu |
| Ile | Glu | Glu | Glu 35 | Val | Ala | Lys | Leu 40 | Leu | Lys | Leu | Lys | Ala 45 | Gln | Leu | Gly |
| Pro | Asp 50 | Glu | Ser | Lys | Gln | Lys | Phe 55 | Val | Leu | Lys | Thr 60 | Pro | Lys | Gly | Thr |
| Arg 65 | Asp | Tyr | Ser | Pro | Arg | Gln | Met | Ala | Val | Arg | Glu | Lys | Val | Phe | Asp 80 |
| Val | Ile | Ile | Arg 85 | Cys | Phe | Lys | Arg | His | Gly 90 | Ala | Glu | Val | Ile | Asp 95 | Thr |
| Pro | Val | Phe | Glu 100 | Leu | Lys | Glu | Thr | Leu 105 | Met | Gly | Lys | Tyr | Gly | Glu | Asp |
| Ser | Lys | Leu | Ile 115 | Tyr | Asp | Leu | Lys | Asp 120 | Gln | Gly | Gly | Glu 125 | Leu | Leu | Ser |
| Leu | Arg 130 | Tyr | Asp | Leu | Thr | Val | Pro | Phe 135 | Ala | Arg | Tyr 140 | Leu | Ala | Met | Asn |
| Lys 145 | Leu | Thr | Asn | Ile | Lys | Arg | Tyr | His 150 | Ile | Ala | Lys 155 | Val | Tyr | Arg | Arg 160 |
| Asp | Asn | Pro | Ala 165 | Met | Thr | Arg | Gly | Arg 170 | Tyr | Arg | Glu | Phe | Tyr | Gln | Cys |
| Asp | Phe | Asp | Ile 180 | Ala | Gly | Asn | Phe | Asp 185 | Pro | Met | Ile | Pro | Asp | Ala | Glu |
| Cys | Leu | Lys 195 | Ile | Met | Cys | Glu | Ile 200 | Leu | Ser | Ser | Leu | Gln 205 | Ile | Gly | Asp |
| Phe 210 | Leu | Val | Lys | Val | Asn | Asp | Arg 215 | Arg | Ile | Leu | Asp 220 | Gly | Met | Phe | Ala |
| Ile 225 | Cys | Gly | Val | Ser | Asp | Ser | Lys 230 | Phe | Arg | Thr | Ile 235 | Cys | Ser | Ser | Val 240 |
| Asp | Lys | Leu | Asp 245 | Lys | Val | Ser | Trp | Glu | Glu | Val | Lys 250 | Asn | Glu | Met | Val |
| Gly | Glu | Lys | Gly 260 | Leu | Ala | Pro | Glu | Val 265 | Ala | Asp | Arg | Ile | Gly | Asp | Tyr |
| Val | Gln | Gln | His 275 | Gly | Gly | Val | Ser 280 | Leu | Val | Glu | Gln | Leu 285 | Leu | Gln | Asp |
| Pro | Lys 290 | Leu | Ser | Gln | Asn | Lys | Gln 295 | Ala | Leu | Glu | Gly 300 | Leu | Gly | Asp | Leu |
| Lys 305 | Leu | Leu | Phe | Glu | Tyr | Leu | Thr | Leu | Phe | Gly 315 | Ile | Asp | Asp | Lys | Ile 320 |

```

Ser Phe Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val
      325                      330                      335
Ile Tyr Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu
      340                      345                      350
Pro Leu Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu
      355                      360                      365
Val Gly Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu
      370                      375                      380
Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu
      385                      390                      395                      400
Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Leu Glu Gly Lys Pro Ile
      405                      410                      415
Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr His His His His His His
      420                      425                      430

```

<210> 40

<211> 137

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий
N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 40

```

Met His His His His His His Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu
  1                      5                      10                      15
Gly Leu Asp Ser Thr Gly Ser Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu
      20                      25                      30
Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala
  35                      40                      45
Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys
  50                      55                      60
Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr
  65                      70                      75                      80
Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu
      85                      90                      95
Lys Val Phe Asp Val Ile Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu
      100                      105                      110
Val Ile Asp Thr Pro Val Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys
      115                      120                      125
Tyr Gly Glu Asp Ser Lys Leu Leu Glu
  130                      135

```

<210> 41

<211> 137

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий
C-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 41

```

Met Gly Ser Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Leu Val Lys Leu Gln
  1                      5                      10                      15
Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu
      20                      25                      30
Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly
      35                      40                      45
Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr

```

```

      50              55              60
Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp
65              70              75              80
Val Ile Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr
      85              90              95
Pro Val Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp
      100              105              110
Ser Lys Leu Leu Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu
      115              120              125
Asp Ser Thr His His His His His
130              135

```

<210> 42

<211> 294

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий
N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 42

```

Met His His His His His His Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu
1      5      10      15
Gly Leu Asp Ser Thr Gly Ser Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Leu
      20      25      30
Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala
      35      40      45
Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys
      50      55      60
Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr
65      70      75      80
Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu
      85      90      95
Lys Val Phe Asp Val Ile Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu
      100      105      110
Val Ile Asp Thr Pro Val Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys
      115      120      125
Tyr Gly Glu Asp Ser Lys Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly
      130      135      140
Glu Leu Leu Ser Leu Arg Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr
145      150      155      160
Leu Ala Met Asn Lys Leu Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys
      165      170      175
Val Tyr Arg Arg Asp Asn Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu
      180      185      190
Phe Tyr Gln Cys Asp Phe Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile
      195      200      205
Pro Asp Ala Glu Cys Leu Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu
      210      215      220
Gln Ile Gly Asp Phe Leu Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp
225      230      235      240
Gly Met Phe Ala Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile
      245      250      255
Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val Gly Tyr Pro Trp Trp Asn
      260      265      270
Ser Cys Ser Arg Ile Leu Asn Tyr Pro Lys Thr Ser Arg Pro Trp Arg
      275      280      285
Ala Trp Glu Thr Leu Glu
290

```

<210> 43
 <211> 294
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий
 С-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 43

```

Met Gly Ser Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln
 1           5           10           15
Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu
      20           25           30
Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly
      35           40           45
Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr
      50           55           60
Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp
      65           70           75           80
Val Ile Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr
      85           90           95
Pro Val Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp
      100          105          110
Ser Lys Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser
      115          120          125
Leu Arg Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn
      130          135          140
Lys Leu Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg
      145          150          155          160
Asp Asn Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys
      165          170          175
Asp Phe Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu
      180          185          190
Cys Leu Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp
      195          200          205
Phe Leu Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala
      210          215          220
Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val
      225          230          235          240
Asp Lys Leu Asp Lys Val Gly Tyr Pro Trp Trp Asn Ser Cys Ser Arg
      245          250          255
Ile Leu Asn Tyr Pro Lys Thr Ser Arg Pro Trp Arg Ala Trp Glu Thr
      260          265          270
Leu Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
      275          280          285
His His His His His His
290

```

<210> 44
 <211> 432
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид гистидил-тРНК-синтетазы

<400> 44

```

ggatccgcag aacgtgccgc cctggaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
ggtctgaaac agcagaaagc aagcgtgaa ctgatcgaag aagaagtggc gaaactgctg 120
aaactgaaag cacagctggg tctgatgaa tcaaaacaaa aattcgctct gaaaactccg 180
aaaggaaccc gtgactattc tctcgtcaa atggccgtcc gtgaaaaagt gttcgacgtg 240

```

```

atcattcgct gctttaaacg ccatggtgcc gaagtgattg ataccccggt gtttgagctg 300
aaagagacac tgatgggcaa atatggtgag gacagcaaac tgatttatga cctgaaagat 360
caggggtggtg aactgctgag tctgcgctat gatctgacag ttccgtttgc ccgttatctg 420
gcaatgctcg ag 432

```

<210> 45
 <211> 1233
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> кодон-оптимизированный полинуклеотид тистидил-тРНК-синтетазы

```

<400> 45
ggatccgcag aacgtgccgc cctggaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
ggtctgaaac agcagaaagc aagcgctgaa ctgacgaaag aagaagtggc gaaactgctg 120
aaactgaaag cacagctggg tctgatgaa tcaaaacaaa aattcgctct gaaaactccg 180
aaaggaaccc gtgactatct tctcgtcaa atggccgtcc gtgaaaaagt gttcgacgtg 240
atcattcgct gctttaaacg ccatggtgcc gaagtgattg ataccccggt gtttgagctg 300
aaagagacac tgatgggcaa atatggtgag gacagcaaac tgatttatga cctgaaagat 360
caggggtggtg aactgctgag tctgcgctat gatctgacag ttccgtttgc ccgttatctg 420
gcaatgaata aactgaccaa cattaacgc tatcacattg ctaaagtcta tcgccgtgac 480
aatcctgcta tgaccctggg tcgttatcgt gagttctatc agtgtgactt cgatattgcc 540
ggcaactttg atccgatgat cccggatgct gaatgcctga aaatcatgtg tgagatcctg 600
agcagtctgc agattggcga ttctctggtg aaagtcaacg atcgccgtat tctggatggc 660
atgttcgcca tctgtggtgt tagcgactcc aaattccgta ccactctgtg tagtgtggac 720
aaactggata aagtgagctg ggaggaggtg aaaaacgaaa tgggtgggca gaaaggctctg 780
gtcctgaag tggctgaccg tattggtgat tatgtccagc agcacggtgg agtatcactg 840
gttgagcaac tgctgcaaga ccctaaactg agtcagaata aacaggccct ggagggactg 900
ggagatctga aactgctggt cgagtatctg accctgttcg gtatcgatga caaaatctcc 960
tttgacctgt cactggctcg tggactggac tattataccg gcgtgatcta tgaagctgta 1020
ctgctgcaaa ctccagcaca agcaggtgaa gagcctctgg gtgtgggtag ttagaccgct 1080
gggggacgtt atgatggact ggtggggatg ttcgacccta aaggccgtaa agttccgtgt 1140
gtgggtctga gtatcggtgt tgagcgatc ttttccatcg tcgagcaacg tctggaagca 1200
ctggaggaaa aaatccgtac gaccgaactc gag 1233

```

<210> 46
 <211> 348
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> кодон-оптимизированный полинуклеотид тистидил-тРНК-синтетазы

```

<400> 46
ggatccgcag aacgtgccgc cctggaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
ggtctgaaac agcagaaagc aagcgctgaa ctgacgaaag aagaagtggc gaaactgctg 120
aaactgaaag cacagctggg tctgatgaa tcaaaacaaa aattcgctct gaaaactccg 180
aaaggaaccc gtgactatct tctcgtcaa atggccgtcc gtgaaaaagt gttcgacgtg 240
atcattcgct gctttaaacg ccatggtgcc gaagtgattg ataccccggt gtttgagctg 300
aaagagacac tgatgggcaa atatggtgag gacagcaaac tgctcgag 348

```

<210> 47
 <211> 819
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> кодон-оптимизированный полинуклеотид тистидил-тРНК-синтетазы

```

<400> 47
ggatccgcag aacgtgccgc cctggaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
ggtctgaaac agcagaaagc aagcgctgaa ctgacgaaag aagaagtggc gaaactgctg 120

```

```

aaactgaaag cacagctggg tcttgatgaa tcaaaacaaa aattcgctcct gaaaactccg 180
aaaggaaccc gtgactattc tcctcgtaaa atggccgtcc gtgaaaaagt gttcgacgtg 240
atcattcgct gctttaaacg ccatgggtgcc gaagtgttg ataccccggt gtttgagctg 300
aaagagacac tgatgggcaa atatgggtgag gacagcaaac tgatctatga cctgaaagac 360
caaggcgggtg aactgctgtc cctgcgttat gatctgactg tgccgtttgc ccgttatctg 420
gccatgaata aactgacgaa cattaacgc tatcacattg ccaaagtgtg tcgccgtgac 480
aatcctgcta tgactcgtgg acgttatcgt gaattctatc agtgtgactt cgatattgcc 540
ggcaacttcg accctatgat tccggatgct gaatgcctga aaatcatgtg tgagatcctg 600
agcagcctgc aaattgggtga cttcctgggtg aaagtgaatg accgtcgtat cctggatggc 660
atgtttgccca tttgtgggtg gagcgattcc aaattccgta ccatctgtag tagtgtggac 720
aaactggata aagtgggcta tccgtgggtg aactcttgta gccgtattct gaactatcct 780
aaaaccagcc gcccggtggcg tgcttgggaa actctcgag 819

```

<210> 48

<211> 395

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 48

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1      5      10      15
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20     25     30
Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35     40     45
Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Asp Phe Asp Ile
50     55     60
Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu Lys Ile
65     70     75     80
Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu Val Lys
85     90     95
Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys Gly Val
100    105    110
Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp
115    120    125
Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu Lys Gly
130    135    140
Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln Gln His
145    150    155    160
Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys Leu Ser
165    170    175
Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu Leu Phe
180    185    190
Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe Asp Leu
195    200    205
Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr Glu Ala
210    215    220
Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu Gly Val
225    230    235    240
Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly Met Phe
245    250    255
Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile Gly Val
260    265    270
Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu
275    280    285
Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys
290    295    300
Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala
305    310    315    320
Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn
325    330    335
Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile

```


340 345 350
 Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr
 355 360 365
 Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile
 370 375 380
 Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
 385 390 395

<210> 49
 <211> 1188
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
 ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
 ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
 gattttgaca ttgctgggaa ctttgatccc atgatccctg atgcagagtg cctgaagatc 240
 atgtgcgaga tcctgagttc acttcagata ggcgacttcc tggccaaggt aaacgatcga 300
 cgcatcttag atgggatgtt tgctatctgt ggtgtttctg acagcaagtt ccgtaccatc 360
 tgctcctcag tagacaagct ggacaagggt tcctgggaag aggtgaagaa tgagatgggtg 420
 ggagagaagg gccttgccac tgaggtggct gaccgcattg gggactatgt ccagcaacat 480
 ggtgggggtat ccctgggtga acagctgctc caggatccta aactatccca aaacaagcag 540
 gccttgaggg gcctgggaga cctgaagttg ctctttgagt acctgaccct atttggcatt 600
 gatgacaaaa tctcctttga cctgagcctt gctcgagggc tggattacta cactgggggtg 660
 atctatgagg cagtgtctgt acagacccca gccagggcag ggaagagcc cctgggtgtg 720
 ggcatgtgtg ctgctggagg acgctatgat gggctagtgg gcatgttcga ccccaaaggg 780
 cgcaaggtgc catgtgtggg gctcagcatt ggggtggagc ggattttctc catcgtggaa 840
 cagagactag aggctttgga ggagaagata cggaccacgg agacacaggt gcttgtggca 900
 tctgcacaga agaagctgct agaggaaaga ctaaagcttg tctcagaact gtgggatgct 960
 gggatcaagg ctgagctgct gtacaagaag aacccaaagc tactgaacca gttacagtac 1020
 tgtgaggagg caggcatccc actggtggct atcatcggcg agcaggaact caaggatggg 1080
 gtcacaaagc tccgttcagt gacgagcagg gaagaggtgg atgtccgaag agaagacctt 1140
 gtggaggaaa tcaaaaggag aacaggccag cccctctgca tctgctga 1188

<210> 50
 <211> 359
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 50
 Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
 20 25 30
 Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35 40 45
 Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Val Asn Asp Arg
 50 55 60
 Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys
 65 70 75 80
 Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val Ser Trp
 85 90 95
 Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu Lys Gly Leu Ala Pro Glu
 100 105 110
 Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln Gln His Gly Gly Val Ser
 115 120 125
 Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys Leu Ser Gln Asn Lys Gln
 130 135 140
 Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu Leu Phe Glu Tyr Leu Thr
 145 150 155 160
 Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ser Leu Ala Arg

165 170 175
 Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr Glu Ala Val Leu Leu Gln
 180 185 190
 Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu Gly Val Gly Ser Val Ala
 195 200 205
 Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly Met Phe Asp Pro Lys Gly
 210 215 220
 Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe
 225 230 235 240
 Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr
 245 250 255
 Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu
 260 265 270
 Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala
 275 280 285
 Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr
 290 295 300
 Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu
 305 310 315 320
 Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu
 325 330 335
 Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr
 340 345 350
 Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
 355

<210> 51
 <211> 1080
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
 ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
 ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
 gtaaacgata gacgcattct agatgggatg tttgctatct gtggtgtttc tgacagcaag 240
 ttccgtacca tctgctcctc agtagacaag ctggacaagg tgtcctggga agagggtgaag 300
 aatgagatgg tgggagagaa gggccttgca cctgaggtgg ctgaccgcat tggggactat 360
 gtccagcaac atggtgggggt atccctgggtg gaacagctgc tccaggatcc taaactatcc 420
 caaaacaagc aggccttgga gggcctggga gacctgaagt tgctctttga gtacctgacc 480
 ctattttgga ttgatgacaa aatctccttt gacctgagcc ttgctcgagg gctggattac 540
 tacactgggg tgatctatga ggcagtgtct ctacagaccc cagcccaggc aggggaagag 600
 cccttggttg tgggcagtgt ggctgtctga ggacgctatg atgggctagt gggcatgttc 660
 gaccccaaag ggcgcaaggt gccatgtgtg gggctcagca ttggggtgga gcgattttc 720
 tccatcgtgg aacagagact agaggctttg gaggagaaga tacggaccac ggagacacag 780
 gtgcttgttg catctgcaca gaagaagctg cttagaggaaa gactaaagct tgtctcagaa 840
 ctgtgggatg ctgggatcaa ggctgagctg ctgtacaaga agaaccctaaa gctactgaac 900
 cagttacagt actgtgagga ggcaggcatc ccactggtgg ctatcatcgg cgagcaggaa 960
 ctcaaggatg gggatcatca gctccgttca gtgacgagca ggggaagaggt ggatgtccga 1020
 agagaagacc ttgtggagga aatcaaaagg agaacaggcc agcccctctg catctgctga 1080

<210> 52
 <211> 399
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 52

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Glu | Glu | Val | Ala | Lys | Leu | Leu | Lys | Leu | Lys | Ala | Gln | Leu | Gly | Pro | Asp |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Glu | Ser | Lys | Gln | Lys | Phe | Val | Leu | Lys | Thr | Pro | Lys | Gly | Thr | Arg | Asp |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Tyr | Ser | Pro | Arg | Gln | Met | Ala | Val | Arg | Glu | Lys | Val | Phe | Asp | Val | Ile |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Ile | Arg | Cys | Phe | Lys | Arg | His | Gly | Ala | Glu | Val | Ile | Asp | Thr | Pro | Val |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Phe | Glu | Leu | Lys | Val | Asn | Asp | Arg | Arg | Ile | Leu | Asp | Gly | Met | Phe | Ala |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Ile | Cys | Gly | Val | Ser | Asp | Ser | Lys | Phe | Arg | Thr | Ile | Cys | Ser | Ser | Val |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Asp | Lys | Leu | Asp | Lys | Val | Ser | Trp | Glu | Glu | Val | Lys | Asn | Glu | Met | Val |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Gly | Glu | Lys | Gly | Leu | Ala | Pro | Glu | Val | Ala | Asp | Arg | Ile | Gly | Asp | Tyr |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Val | Gln | Gln | His | Gly | Gly | Val | Ser | Leu | Val | Glu | Gln | Leu | Leu | Gln | Asp |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Pro | Lys | Leu | Ser | Gln | Asn | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Gly | Leu | Gly | Asp | Leu |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| Lys | Leu | Leu | Phe | Glu | Tyr | Leu | Thr | Leu | Phe | Gly | Ile | Asp | Asp | Lys | Ile |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Ser | Phe | Asp | Leu | Ser | Leu | Ala | Arg | Gly | Leu | Asp | Tyr | Tyr | Thr | Gly | Val |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Ile | Tyr | Glu | Ala | Val | Leu | Leu | Gln | Thr | Pro | Ala | Gln | Ala | Gly | Glu | Glu |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Pro | Leu | Gly | Val | Gly | Ser | Val | Ala | Ala | Gly | Gly | Arg | Tyr | Asp | Gly | Leu |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| Val | Gly | Met | Phe | Asp | Pro | Lys | Gly | Arg | Lys | Val | Pro | Cys | Val | Gly | Leu |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| Ser | Ile | Gly | Val | Glu | Arg | Ile | Phe | Ser | Ile | Val | Glu | Gln | Arg | Leu | Glu |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| Ala | Leu | Glu | Glu | Lys | Ile | Arg | Thr | Thr | Glu | Thr | Gln | Val | Leu | Val | Ala |
| | | 290 | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| Ser | Ala | Gln | Lys | Lys | Leu | Leu | Glu | Glu | Arg | Leu | Lys | Leu | Val | Ser | Glu |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |
| Leu | Trp | Asp | Ala | Gly | Ile | Lys | Ala | Glu | Leu | Leu | Tyr | Lys | Lys | Asn | Pro |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| Lys | Leu | Leu | Asn | Gln | Leu | Gln | Tyr | Cys | Glu | Glu | Ala | Gly | Ile | Pro | Leu |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | |
| Val | Ala | Ile | Ile | Gly | Glu | Gln | Glu | Leu | Lys | Asp | Gly | Val | Ile | Lys | Leu |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| Arg | Ser | Val | Thr | Ser | Arg | Glu | Glu | Val | Asp | Val | Arg | Arg | Glu | Asp | Leu |
| | | 370 | | | | 375 | | | | | | | | | |

```
<210> 53
<211> 1200
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
```

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| <400> 53 | | | | | | |
| atggcagagc | gtgcggcgct | ggaggagctg | gtgaaacttc | agggagagcg | cgtgcgaggc | 60 |
| ctcaagcagc | agaaggccag | cgccgagctg | atcgaggagg | aggtggcgaa | actcctgaaa | 120 |
| ctgaaggcac | agctgggtcc | tgatgaaagc | aaacagaaat | ttgtgctcaa | aacccccaa | 180 |
| ggcacaagag | actatagtcc | ccggcagatg | gcagttcgcg | agaaggtggt | tgacgtaatc | 240 |
| atccgttgct | tcaagcgcca | cggtgcagaa | gtcattgata | cacctgtatt | tgaactaaag | 300 |
| gtaaacgata | gacgcattct | agatgggatg | tttgctatct | gtggtgtttc | tgacagcaag | 360 |
| ttccgtacca | tctgctcttc | agtagacaag | ctggacaagg | tgtcctggga | agaggtgaag | 420 |
| aatgagatgg | tgggagagaa | gggccttgca | cctgagggtg | ctgaccgcac | tggggactat | 480 |

```

gtccagcaac atggtgggggt atccctgggtg gaacagctgc tccaggatcc taaactatcc 540
caaaacaagc aggccttgga gggcctggga gacctgaagt tgctctttga gtacctgacc 600
ctatttggca ttgatgacaa aatctccttt gacctgagcc ttgctcgagg gctggattac 660
tacactgggg tgatctatga ggcagtgtgt ctacagaccc cagcccaggc aggggaagag 720
cccctgggtg tgggcagtgt ggctgctgga ggacgctatg atgggctagt gggcatgttc 780
gaccccaaag ggcgcaaggt gccatgtgtg gggctcagca ttgggggtgga gcggattttc 840
tccatcgtgg aacagagact agaggctttg gaggagaaga tacggaccac ggagacacag 900
gtgcttgtgg catctgcaca gaagaagctg ctagaggaaa gactaaagct tgtctcagaa 960
ctgtgggatg ctgggatcaa ggctgagctg ctgtacaaga agaaccctaaa gctactgaac 1020
cagttacagt actgtgagga ggcaggcatc ccactgggtg ctatcatcgg cgagcaggaa 1080
ctcaaggatg gggcatcaa gctccgttca gtgacgagca ggggaagagg ggatgtccga 1140
agagaagacc ttgtggagga aatcaaaagg agaacaggcc agcccctctg catctgctga 1200

```

<210> 54

<211> 473

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 54

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1      5      10      15
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20     25     30
Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35     40     45
Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50     55     60
Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65     70     75     80
Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85     90     95
Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100    105    110
Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115    120    125
Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
130    135    140
Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145    150    155    160
Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Val Asn
165    170    175
Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys Gly Val Ser Asp
180    185    190
Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val
195    200    205
Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu Lys Gly Leu Ala
210    215    220
Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln Gln His Gly Gly
225    230    235    240
Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys Leu Ser Gln Asn
245    250    255
Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu Leu Phe Glu Tyr
260    265    270
Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ser Leu
275    280    285
Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr Glu Ala Val Leu
290    295    300
Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu Gly Val Gly Ser
305    310    315    320
Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly Met Phe Asp Pro
325    330    335
Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile Gly Val Glu Arg

```

```

          340          345          350
Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile
          355          360          365
Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu
          370          375          380
Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile
385          390          395          400
Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu
          405          410          415
Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu
          420          425          430
Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg
          435          440          445
Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg
          450          455          460
Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
465          470

```

<210> 55
 <211> 1422
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

```

<400> 55
atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
ggcacaagag actatagtc cccgcagatg gcagttcgcg agaaggtggt tgacgtaatc 240
atccgttgct tcaagcgcca cgggtgcagaa gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag 300
gaaacactga tgggaaagta tggggaagac tccaagctta tctatgacct gaaggaccag 360
ggcgggggagc tcctgtccct tcgctatgac ctcaactgttc cttttgctcg gtatattggca 420
atgaataaac tgaccaacat taaacgctac cacatagcaa aggtatatcg gcgggataac 480
ccagccatga cccgtggccg ataccgggaa ttctaccagt gtgtaaacga tcgacgcatt 540
ctagatggga tgtttgctat ctgtggtggt tctgacagca agttccgtac catctgctcc 600
tcagtagaca agctggacaa ggtgtcctgg gaagagggtga agaagagat ggtgggagag 660
aagggccttg cacctgaggt ggctgaccgc attggggact atgtccagca acatggtggg 720
gtatccctgg tggaacagct gctccaggat cctaaactat cccaaaacaa gcaggccttg 780
gagggcctgg gagacctgaa gttgctcttt gagtacctga ccctatttgg cattgatgac 840
aaaatctcct ttgacctgag ccttgctcga gggtgggatt actacactgg ggtgatctat 900
gaggcagtg tgcacagac cccagcccag gcaggggaag agcccctggg tgtgggcagt 960
gtggctgctg gaggacgcta tgatgggcta gtgggcatgt tcgaccccaa agggcgcaag 1020
gtgccatgtg tggggctcag cattggggtg gaggcgattt tctccatcgt ggaacagaga 1080
ctagaggctt tggaggagaa gatacggacc acggagacac aggtgcttgt ggcactctgca 1140
cagaagaagc tgctagagga aagactaaag cttgtctcag aactgtggga tgctgggatc 1200
aaggctgagc tgctgtacaa gaagaacca aagctactga accagttaca gtactgtgag 1260
gaggcagga tccactggt ggctatcatc ggcgagcagg aactcaagga tggggtcac 1320
aagctccgtt cagtgcagag cagggaagag gtggatgtcc gaagagaaga ccttgtggag 1380
gaaatcaaaa ggagaacagg ccagcccctc tgcactgtct ga 1422

```

<210> 56
 <211> 469
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

```

<400> 56
Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1          5          10          15
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30
Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

```

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

<210> 57

<211> 1410

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 57

atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60

```

ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
gaaacactga tgggaaagta tggggaagac tccaagctta tctatgacct gaaggaccag 240
ggcggggagc tcctgtccct tcgctatgac ctactgttc cttttgctcg gtatttggca 300
atgaataaac tgaccaacat taaacgctac cacatagcaa aggtatatcg gcgggataac 360
ccagccatga cccgtggcgg ataccgggaa ttctaccagt gtgattttga cattgctggg 420
aactttgatc ccatgatccc tgatgcagag tgectgaaga tcatgtgcga gatcctgagt 480
tcacttcaga taggcgactt cctgggtcaag gtaaacgata gacgcattct agatgggatg 540
tttgctatct gtggtgtttc tgacagcaag ttccgtacca tctgctcctc agtagacaag 600
ctggacaagg tgccttggga agaggtgaag aatgagatgg tgggagagaa gggccttgca 660
cctgaggtgg ctgaccgcat tggggactat gtccagcaac atggtggggg atccctggtg 720
gaacagctgc tccaggatcc taaactatcc caaaacaagc aggccttgga gggcctggga 780
gacctgaagt tgctctttga gtacctgacc ctatttggca ttgatgacaa aatctccttt 840
gacctgagcc ttgctcgagg gctggattac tacactgggg tgatctatga ggcagtgtctg 900
ctacagaccc cagcccaggc aggggaagag cccctgggtg tgggcagtgt ggctgctgga 960
ggacgctatg atgggctagt gggcatgttc gaccccaaag ggcgcaaggt gccatgtgtg 1020
gggctcagca ttgggggtgga gcggattttc tccatcgtgg aacagagact agaggctttg 1080
gaggagaaga tacggaccac ggagacacag gtgcttgtgg catctgcaca gaagaagctg 1140
ctagaggaaa gactaaagct tgtctcagaa ctgtgggatg ctgggatcaa ggctgagctg 1200
ctgtacaaga agaaccctaa gctactgaac cagttacagt actgtgagga ggcaggcatc 1260
ccactggtgg ctatcatcgg cgagcaggaa ctcaaggatg gggcatcaa gctccgttca 1320
gtgacgagca gggaagaggt ggatgtccga agagaagacc ttgtggagga aatcaaaaag 1380
agaacaggcc agcccctctg catctgctga 1410

```

<210> 58

<211> 435

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 58

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1           5           10          15
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30
Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45
Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
          50          55          60
Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65          70          75          80
Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
          85          90          95
Phe Glu Leu Lys Asp Phe Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile
          100         105         110
Pro Asp Ala Glu Cys Leu Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu
          115         120         125
Gln Ile Gly Asp Phe Leu Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp
          130         135         140
Gly Met Phe Ala Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile
145         150         155         160
Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys
          165         170         175
Asn Glu Met Val Gly Glu Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg
          180         185         190
Ile Gly Asp Tyr Val Gln Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln
          195         200         205
Leu Leu Gln Asp Pro Lys Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly
          210         215         220
Leu Gly Asp Leu Lys Leu Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile
225         230         235         240
Asp Asp Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr
          245         250         255

```

Tyr Thr Gly Val Ile Tyr Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln
 260 265 270
 Ala Gly Glu Glu Pro Leu Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg
 275 280 285
 Tyr Asp Gly Leu Val Gly Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro
 290 295 300
 Cys Val Gly Leu Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu
 305 310 315 320
 Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln
 325 330 335
 Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys
 340 345 350
 Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr
 355 360 365
 Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala
 370 375 380
 Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly
 385 390 395 400
 Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg
 405 410 415
 Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
 420 425 430
 Cys Ile Cys
 435

<210> 59
 <211> 1308
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 59
 atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
 ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
 ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
 ggcacaagag actatagtcc ccggcagatg gcagttcgcg agaaggtgtt tgacgtaatc 240
 atccgttgct tcaagcgcca cgggtgcagaa gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag 300
 gatttttgaca ttgctgggaa ctttgatccc atgatccctg atgcagagtg cctgaagatc 360
 atgtgcgaga tcttgagttc acttcagata ggcgacttcc tgggtcaagggt aaacgatcga 420
 cgcattctag atgggatgtt tgctatctgt ggtgtttctg acagcaagtt ccgtaccatc 480
 tgctcctcag tagacaagct ggacaagggt tcttggaag aggtgaagaa tgagatgggtg 540
 ggagagaagg gccttgccac tgaggtggct gaccgcattg gggactatgt ccagcaacat 600
 ggtgggggat ccctgggtga acagctgctc caggatccta aactatccca aaacaagcag 660
 gccttgaggg gcctgggaga cctgaagttg ctctttgagt acctgaccct atttggcatt 720
 gatgacaaaa tctcctttga cctgagcctt gctcgagggc tggattacta cactgggggtg 780
 atctatgagg cagtgtgtgt acagacccca gccagggcag ggggaagagcc cctgggtgtg 840
 ggcagtgtgg ctgctggagg acgctatgat gggctagtgg gcatgttcga ccccaaaggg 900
 cgcaagggtc catgtgtggg gctcagcatt ggggtggagc ggattttctc catcgtggaa 960
 cagagactag aggctttgga ggagaagata cggaccacgg agacacaggt gcttgtggca 1020
 tctgcacaga agaagctgct agaggaaaga ctaaagcttg tctcagaact gtgggatgct 1080
 gggatcaagg ctgagctgct gtacaagaag aacccaaagc tactgaacca gttacagtac 1140
 tgtgaggagg caggcatccc actggtggct atcatcggcg agcaggaact caaggatggg 1200
 gtcacaaagc tccgttcagt gacgagcagg gaagaggtgg atgtccgaag agaagacctt 1260
 gtggaggaaa tcaaaaggag aacaggccag ccctctgca tctgctga 1308

<210> 60
 <211> 171
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 60
 Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15


```

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
      20                      25                      30
Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
      35                      40                      45
Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Ala Leu Glu Glu
      50                      55                      60
Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys
      65                      70                      75                      80
Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala
      85                      90                      95
Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn
      100                     105                     110
Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile
      115                     120                     125
Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr
      130                     135                     140
Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile
      145                     150                     155                     160
Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
      165                     170

```

<210> 61
 <211> 516
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

```

<400> 61
atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaa 180
gctttggagg agaagatacg gaccacggag acacagggtgc ttgtggcatc tgcacagaag 240
aagctgctag aggaaagact aaagcttgct tcagaactgt gggatgctgg gatcaaggct 300
gagctgctgt acaagaagaa cccaagcta ctgaaccagt tacagtactg tgaggaggca 360
ggcatcccac tgggtggctat catcggcgag caggaactca aggatggggg catcaagctc 420
cgttcagtga cgagcagggg agaggtggat gtccgaagag aagaccttgt ggaggaaatc 480
aaaaggagaa caggccagcc cctctgcac tgcctga 516

```

<210> 62
 <211> 211
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

```

<400> 62
Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
  1                      5                      10                      15
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
      20                      25                      30
Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
      35                      40                      45
Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
      50                      55                      60
Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
      65                      70                      75                      80
Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
      85                      90                      95
Phe Glu Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln
      100                     105                     110
Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys
      115                     120                     125
Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr
      130                     135                     140
Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala

```

145 150 155 160
 Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly
 165 170 175
 Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg
 180 185 190
 Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
 195 200 205
 Cys Ile Cys
 210

<210> 63
 <211> 636
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 63
 atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
 ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
 ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aaccccccaag 180
 ggcaacaagag actatagtcc cgggcagatg gcagttcgcg agaaggtggt tgacgtaatc 240
 atccgttgct tcaagcgcca cgggtgcagaa gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag 300
 gctttggagg agaagatacg gaccacggag acacagggtgc ttgtggcatc tgcacagaag 360
 aagctgctag aggaaagact aaagcttgct tcagaactgt gggatgctgg gatcaaggct 420
 gagctgctgt acaagaagaa cccaaagcta ctgaaccagt tacagtactg tgaggaggca 480
 ggcatccac tggtggctat catcggcgag caggaactca aggatggggt catcaagctc 540
 cgttcagtga cgagcaggga agaggtggat gtccgaagag aagacctgt ggaggaaatc 600
 aaaaggagaa caggccagcc cctctgcata tgctga 636

<210> 64
 <211> 141
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 64
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 1 5 10 15
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 20 25 30
 Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 35 40 45
 Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
 50 55 60
 Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
 65 70 75 80
 Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
 85 90 95
 Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
 100 105 110
 Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
 130 135 140

<210> 65
 <211> 426
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 65
 atgttcgacc ccaaagggcg caaggtgcc a tgtgtggggc tcagcattgg ggtggagcgg 60

```

attttctcca tcgtggaaca gagactagag gctttggagg agaagatacg gaccacggag 120
acacaggtgc ttgtggcatc tgcacagaag aagctgctag aggaaagact aaagcttgct 180
tcagaactgt gggatgctgg gatcaaggct gagctgctgt acaagaagaa cccaaagcta 240
ctgaaccagt tacagtactg tgaggaggca ggcacccac tgggtggctat catcggcgag 300
caggaactca aggatggggt catcaagctc cgttcagtga cgagcaggga agaggtggat 360
gtccgaagag aagaccttgt ggaggaaatc aaaaggagaa caggccagcc cctctgcatc 420
tgctga 426

```

<210> 66
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

```

<400> 66
gaaatttgtg ctcaaaaccc ccaaggattt tgacattgct gggaactttg 50

```

<210> 67
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

```

<400> 67
Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Asp Phe Asp Ile Ala Gly Asn Phe
 1             5             10             15

```

<210> 68
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

```

<400> 68
gaaatttgtg ctcaaaaccc ccaaggtaaa cgatcgacgc attctagatg 50

```

<210> 69
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

```

<400> 69
Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp
 1             5             10             15

```

<210> 70
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

```

<400> 70
tgatacacct gtatttgaac taaaggtaaa cgatcgacgc attctagatg 50

```

<210> 71
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

```

<400> 71
Asp Thr Pro Val Phe Glu Leu Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp
 1             5             10             15

```

<210> 72

<211> 50

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 72

ccgataccgg gaattctacc agtgtgtaaa cgatecagcg attctagatg 50

<210> 73

<211> 16

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 73

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Tyr | Arg | Glu | Phe | Tyr | Gln | Cys | Val | Asn | Asp | Arg | Arg | Ile | Leu | Asp |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

<210> 74

<211> 50

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 74

gaaatttgtg ctcaaaaccc ccaaggaaac actgatggga aagtatgggg 50

<210> 75

<211> 16

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 75

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Phe | Val | Leu | Lys | Thr | Pro | Lys | Glu | Thr | Leu | Met | Gly | Lys | Tyr | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

<210> 76

<211> 50

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 76

tgatacacct gtatttgaac taaaggattt tgacattgct gggaactttg 50

<210> 77

<211> 16

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 77

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Thr | Pro | Val | Phe | Glu | Leu | Lys | Asp | Phe | Asp | Ile | Ala | Gly | Asn | Phe |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

<210> 78

<211> 50

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 78

gaaatttgtg ctcaaaaccc ccaaggcttt ggaggagaag atacggacca 50

<210> 79

<211> 16

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 79

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Phe | Val | Leu | Lys | Thr | Pro | Lys | Ala | Leu | Glu | Glu | Lys | Ile | Arg | Thr |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

<210> 80

<211> 50

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 80

| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|----|
| tgatacacct | gtatttgaac | taaaggcttt | ggaggagaag | atacggacca | 50 |
|------------|------------|------------|------------|------------|----|

<210> 81

<211> 16

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 81

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Thr | Pro | Val | Phe | Glu | Leu | Lys | Ala | Leu | Glu | Glu | Lys | Ile | Arg | Thr |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

<210> 82

<211> 50

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 82

| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|----|
| ctcctcagta | gacaagctgg | acaaggtggg | gtatccctgg | tggaacagct | 50 |
|------------|------------|------------|------------|------------|----|

<210> 83

<211> 105

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 83

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Thr | Thr | Glu | Thr | Gln | Val | Leu | Val | Ala | Ser | Ala | Gln | Lys | Lys | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Leu | Glu | Glu | Arg | Leu | Lys | Leu | Val | Ser | Glu | Leu | Trp | Asp | Ala | Gly | Ile |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | 30 | | | |
| Lys | Ala | Glu | Leu | Leu | Tyr | Lys | Lys | Asn | Pro | Lys | Leu | Leu | Asn | Gln | Leu |
| | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| Gln | Tyr | Cys | Glu | Glu | Ala | Gly | Ile | Pro | Leu | Val | Ala | Ile | Ile | Gly | Glu |
| | 50 | | | | | 55 | | | | 60 | | | | | |
| Gln | Glu | Leu | Lys | Asp | Gly | Val | Ile | Lys | Leu | Arg | Ser | Val | Thr | Ser | Arg |
| 65 | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| Glu | Glu | Val | Asp | Val | Arg | Arg | Glu | Asp | Leu | Val | Glu | Glu | Ile | Lys | Arg |
| | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| Arg | Thr | Gly | Gln | Pro | Leu | Cys | Ile | Cys | | | | | | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | | | |

<210> 84

<211> 318

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 84

```

cggaccacgg agacacaggt gcttgtggca tctgcacaga agaagctgct agaggaaaga 60
ctaaagcttg tctcagaact gtgggatgct gggatcaagg ctgagctgct gtacaagaag 120
aacccaaagc tactgaacca gttacagtac tgtgaggagg caggcatccc actggtggct 180
atcatcggcg agcaggaact caaggatggg gtcacaaagc tccgttcagt gacgagcagg 240
gaagaggtgg atgtccgaag agaagacctt gtggaggaaa tcaaaaggag aacaggccag 300
cccctctgca tctgctga                                     318

```

<210> 85

<211> 130

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 85

```

Met His His His His His His Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu
 1          5          10          15
Gly Leu Asp Ser Thr Gly Ser Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val
          20          25          30
Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser
          35          40          45
Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn
          50          55          60
Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro
65          70          75          80
Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys
          85          90          95
Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp
          100          105          110
Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
115          120          125
Leu Glu
          130

```

<210> 86

<211> 130

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий C-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 86

```

Met Gly Ser Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln
 1          5          10          15
Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp
          20          25          30
Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu
          35          40          45
Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile
          50          55          60
Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val
65          70          75          80
Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu
          85          90          95
Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys Leu Glu Gly Lys
          100          105          110
Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr His His His His
115          120          125

```

His His
130

<210> 87

<211> 419

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 87

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | His | His | His | His | His | His | Gly | Lys | Pro | Ile | Pro | Asn | Pro | Leu | Leu | 1 | 5 | 10 | 15 |
| Gly | Leu | Asp | Ser | Thr | Gly | Ser | Ala | Glu | Arg | Ala | Ala | Leu | Glu | Glu | Leu | 20 | 25 | 30 | |
| Val | Lys | Leu | Gln | Gly | Glu | Arg | Val | Arg | Gly | Leu | Lys | Gln | Gln | Lys | Ala | 35 | 40 | 45 | |
| Ser | Ala | Glu | Leu | Ile | Glu | Glu | Glu | Val | Ala | Lys | Leu | Leu | Lys | Leu | Lys | 50 | 55 | 60 | |
| Ala | Gln | Leu | Gly | Pro | Asp | Glu | Ser | Lys | Gln | Lys | Phe | Val | Leu | Lys | Thr | 65 | 70 | 75 | 80 |
| Pro | Lys | Asp | Phe | Asp | Ile | Ala | Gly | Asn | Phe | Asp | Pro | Met | Ile | Pro | Asp | 85 | 90 | 95 | |
| Ala | Glu | Cys | Leu | Lys | Ile | Met | Cys | Glu | Ile | Leu | Ser | Ser | Leu | Gln | Ile | 100 | 105 | 110 | |
| Gly | Asp | Phe | Leu | Val | Lys | Val | Asn | Asp | Arg | Arg | Ile | Leu | Asp | Gly | Met | 115 | 120 | 125 | |
| Phe | Ala | Ile | Cys | Gly | Val | Ser | Asp | Ser | Lys | Phe | Arg | Thr | Ile | Cys | Ser | 130 | 135 | 140 | |
| Ser | Val | Asp | Lys | Leu | Asp | Lys | Val | Ser | Trp | Glu | Glu | Val | Lys | Asn | Glu | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Met | Val | Gly | Glu | Lys | Gly | Leu | Ala | Pro | Glu | Val | Ala | Asp | Arg | Ile | Gly | 165 | 170 | 175 | |
| Asp | Tyr | Val | Gln | Gln | His | Gly | Gly | Val | Ser | Leu | Val | Glu | Gln | Leu | Leu | 180 | 185 | 190 | |
| Gln | Asp | Pro | Lys | Leu | Ser | Gln | Asn | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Gly | Leu | Gly | 195 | 200 | 205 | |
| Asp | Leu | Lys | Leu | Leu | Phe | Glu | Tyr | Leu | Thr | Leu | Phe | Gly | Ile | Asp | Asp | 210 | 215 | 220 | |
| Lys | Ile | Ser | Phe | Asp | Leu | Ser | Leu | Ala | Arg | Gly | Leu | Asp | Tyr | Tyr | Thr | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gly | Val | Ile | Tyr | Glu | Ala | Val | Leu | Leu | Gln | Thr | Pro | Ala | Gln | Ala | Gly | 245 | 250 | 255 | |
| Glu | Glu | Pro | Leu | Gly | Val | Gly | Ser | Val | Ala | Ala | Gly | Gly | Arg | Tyr | Asp | 260 | 265 | 270 | |
| Gly | Leu | Val | Gly | Met | Phe | Asp | Pro | Lys | Gly | Arg | Lys | Val | Pro | Cys | Val | 275 | 280 | 285 | |
| Gly | Leu | Ser | Ile | Gly | Val | Glu | Arg | Ile | Phe | Ser | Ile | Val | Glu | Gln | Arg | 290 | 295 | 300 | |
| Leu | Glu | Ala | Leu | Glu | Glu | Lys | Ile | Arg | Thr | Thr | Glu | Thr | Gln | Val | Leu | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Val | Ala | Ser | Ala | Gln | Lys | Lys | Leu | Leu | Glu | Glu | Arg | Leu | Lys | Leu | Val | 325 | 330 | 335 | |
| Ser | Glu | Leu | Trp | Asp | Ala | Gly | Ile | Lys | Ala | Glu | Leu | Leu | Tyr | Lys | Lys | 340 | 345 | 350 | |
| Asn | Pro | Lys | Leu | Leu | Asn | Gln | Leu | Gln | Tyr | Cys | Glu | Glu | Ala | Gly | Ile | 355 | 360 | 365 | |
| Pro | Leu | Val | Ala | Ile | Ile | Gly | Glu | Gln | Glu | Leu | Lys | Asp | Gly | Val | Ile | 370 | 375 | 380 | |

Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu
 385 390 395 400
 Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile
 405 410 415
 Cys Leu Glu

<210> 88

<211> 419

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий С-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 88

Met Gly Ser Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln
 1 5 10 15
 Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu
 20 25 30
 Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly
 35 40 45
 Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Asp Phe
 50 55 60
 Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
 65 70 75 80
 Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
 85 90 95
 Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys
 100 105 110
 Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys
 115 120 125
 Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu
 130 135 140
 Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 145 150 155 160
 Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
 165 170 175
 Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 180 185 190
 Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
 195 200 205
 Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 210 215 220
 Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 225 230 235 240
 Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 245 250 255
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 260 265 270
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 275 280 285
 Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 290 295 300
 Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
 305 310 315 320
 Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
 325 330 335
 Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
 340 345 350
 Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser

| | | |
|---|---|-----|
| 355 | 360 | 365 |
| Val Thr Ser Arg Glu Glu | Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu | |
| 370 | 375 | 380 |
| Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys Leu Glu Gly | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr His His His | | |
| 405 | 410 | 415 |
| His His His | | |

<210> 89

<211> 383

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 89

| | |
|---|--|
| Met His His His His His His Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu | |
| 1 5 10 15 | |
| Gly Leu Asp Ser Thr Gly Ser Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Leu | |
| 20 25 30 | |
| Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala | |
| 35 40 45 | |
| Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys | |
| 50 55 60 | |
| Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr | |
| 65 70 75 80 | |
| Pro Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys | |
| 85 90 95 | |
| Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys | |
| 100 105 110 | |
| Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu | |
| 115 120 125 | |
| Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln | |
| 130 135 140 | |
| Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys | |
| 145 150 155 160 | |
| Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu | |
| 165 170 175 | |
| Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe | |
| 180 185 190 | |
| Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr | |
| 195 200 205 | |
| Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu | |
| 210 215 220 | |
| Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly | |
| 225 230 235 240 | |
| Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile | |
| 245 250 255 | |
| Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu | |
| 260 265 270 | |
| Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala | |
| 275 280 285 | |
| Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp | |
| 290 295 300 | |
| Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu | |
| 305 310 315 320 | |
| Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala | |
| 325 330 335 | |

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
 340 345 350
 Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
 355 360 365
 Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys Leu Glu
 370 375 380

<210> 90

<211> 383

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий С-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 90

Met Gly Ser Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln
 1 5 10 15
 Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu
 20 25 30
 Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly
 35 40 45
 Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Val Asn
 50 55 60
 Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys Gly Val Ser Asp
 65 70 75 80
 Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val
 85 90 95
 Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu Lys Gly Leu Ala
 100 105 110
 Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln Gln His Gly Gly
 115 120 125
 Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys Leu Ser Gln Asn
 130 135 140
 Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu Leu Phe Glu Tyr
 145 150 155 160
 Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ser Leu
 165 170 175
 Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr Glu Ala Val Leu
 180 185 190
 Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu Gly Val Gly Ser
 195 200 205
 Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly Met Phe Asp Pro
 210 215 220
 Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile Gly Val Glu Arg
 225 230 235 240
 Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile
 245 250 255
 Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu
 260 265 270
 Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile
 275 280 285
 Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu
 290 295 300
 Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu
 305 310 315 320
 Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg
 325 330 335
 Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg
 340 345 350
 Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys Leu Glu Gly Lys Pro Ile Pro

| | | |
|---|-----|-----|
| 355 | 360 | 365 |
| Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr His His His His His His | | |
| 370 | 375 | 380 |

<210> 91
 <211> 423
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 91

| | | |
|---|--|--|
| Met His His His His His His Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu | | |
| 1 5 10 15 | | |
| Gly Leu Asp Ser Thr Gly Ser Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu | | |
| 20 25 30 | | |
| Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala | | |
| 35 40 45 | | |
| Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys | | |
| 50 55 60 | | |
| Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr | | |
| 65 70 75 80 | | |
| Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu | | |
| 85 90 95 | | |
| Lys Val Phe Asp Val Ile Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu | | |
| 100 105 110 | | |
| Val Ile Asp Thr Pro Val Phe Glu Leu Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile | | |
| 115 120 125 | | |
| Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg | | |
| 130 135 140 | | |
| Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu | | |
| 145 150 155 160 | | |
| Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala | | |
| 165 170 175 | | |
| Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val | | |
| 180 185 190 | | |
| Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu | | |
| 195 200 205 | | |
| Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe | | |
| 210 215 220 | | |
| Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu | | |
| 225 230 235 240 | | |
| Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro | | |
| 245 250 255 | | |
| Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly | | |
| 260 265 270 | | |
| Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys | | |
| 275 280 285 | | |
| Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile | | |
| 290 295 300 | | |
| Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu | | |
| 305 310 315 320 | | |
| Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg | | |
| 325 330 335 | | |
| Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu | | |
| 340 345 350 | | |
| Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu | | |
| 355 360 365 | | |
| Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys | | |
| 370 375 380 | | |

Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp
 385 390 395 400
 Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln
 405 410 415
 Pro Leu Cys Ile Cys Leu Glu
 420

<210> 92

<211> 423

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий С-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 92

Met Gly Ser Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln
 1 5 10 15
 Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu
 20 25 30
 Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly
 35 40 45
 Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr
 50 55 60
 Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp
 65 70 75 80
 Val Ile Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr
 85 90 95
 Pro Val Phe Glu Leu Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met
 100 105 110
 Phe Ala Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser
 115 120 125
 Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu
 130 135 140
 Met Val Gly Glu Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly
 145 150 155 160
 Asp Tyr Val Gln Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu
 165 170 175
 Gln Asp Pro Lys Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly
 180 185 190
 Asp Leu Lys Leu Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp
 195 200 205
 Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr
 210 215 220
 Gly Val Ile Tyr Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly
 225 230 235 240
 Glu Glu Pro Leu Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp
 245 250 255
 Gly Leu Val Gly Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val
 260 265 270
 Gly Leu Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg
 275 280 285
 Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu
 290 295 300
 Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val
 305 310 315 320
 Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys
 325 330 335
 Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile
 340 345 350
 Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 355 | | 360 | | 365 | | | | | | | | | | | |
| Lys | Leu | Arg | Ser | Val | Thr | Ser | Arg | Glu | Glu | Val | Asp | Val | Arg | Arg | Glu |
| 370 | | 375 | | 380 | | | | | | | | | | | |
| Asp | Leu | Val | Glu | Glu | Ile | Lys | Arg | Arg | Thr | Gly | Gln | Pro | Leu | Cys | Ile |
| 385 | | 390 | | 395 | | | | | | | | | | | 400 |
| Cys | Leu | Glu | Gly | Lys | Pro | Ile | Pro | Asn | Pro | Leu | Leu | Gly | Leu | Asp | Ser |
| | | 405 | | 410 | | | | | | | | | | 415 | |
| Thr | His | His | His | His | His | His | | | | | | | | | |
| | | 420 | | | | | | | | | | | | | |

<210> 93

<211> 497

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 93

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | His | His | His | His | His | His | Gly | Lys | Pro | Ile | Pro | Asn | Pro | Leu | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Gly | Leu | Asp | Ser | Thr | Gly | Ser | Ala | Glu | Arg | Ala | Ala | Leu | Glu | Glu | Leu |
| | | 20 | | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Val | Lys | Leu | Gln | Gly | Glu | Arg | Val | Arg | Gly | Leu | Lys | Gln | Gln | Lys | Ala |
| | 35 | | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Ser | Ala | Glu | Leu | Ile | Glu | Glu | Glu | Val | Ala | Lys | Leu | Leu | Lys | Leu | Lys |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Ala | Gln | Leu | Gly | Pro | Asp | Glu | Ser | Lys | Gln | Lys | Phe | Val | Leu | Lys | Thr |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Pro | Lys | Gly | Thr | Arg | Asp | Tyr | Ser | Pro | Arg | Gln | Met | Ala | Val | Arg | Glu |
| | | | 85 | | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Lys | Val | Phe | Asp | Val | Ile | Ile | Arg | Cys | Phe | Lys | Arg | His | Gly | Ala | Glu |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Val | Ile | Asp | Thr | Pro | Val | Phe | Glu | Leu | Lys | Glu | Thr | Leu | Met | Gly | Lys |
| | 115 | | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Tyr | Gly | Glu | Asp | Ser | Lys | Leu | Ile | Tyr | Asp | Leu | Lys | Asp | Gln | Gly | Gly |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Glu | Leu | Leu | Ser | Leu | Arg | Tyr | Asp | Leu | Thr | Val | Pro | Phe | Ala | Arg | Tyr |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Leu | Ala | Met | Asn | Lys | Leu | Thr | Asn | Ile | Lys | Arg | Tyr | His | Ile | Ala | Lys |
| | | | 165 | | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Val | Tyr | Arg | Arg | Asp | Asn | Pro | Ala | Met | Thr | Arg | Gly | Arg | Tyr | Arg | Glu |
| | | 180 | | | | | | 185 | | | | | | 190 | |
| Phe | Tyr | Gln | Cys | Val | Asn | Asp | Arg | Arg | Ile | Leu | Asp | Gly | Met | Phe | Ala |
| | 195 | | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Ile | Cys | Gly | Val | Ser | Asp | Ser | Lys | Phe | Arg | Thr | Ile | Cys | Ser | Ser | Val |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Asp | Lys | Leu | Asp | Lys | Val | Ser | Trp | Glu | Glu | Val | Lys | Asn | Glu | Met | Val |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Gly | Glu | Lys | Gly | Leu | Ala | Pro | Glu | Val | Ala | Asp | Arg | Ile | Gly | Asp | Tyr |
| | | | 245 | | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| Val | Gln | Gln | His | Gly | Gly | Val | Ser | Leu | Val | Glu | Gln | Leu | Leu | Gln | Asp |
| | | 260 | | | | | 265 | | | | | | 270 | | |
| Pro | Lys | Leu | Ser | Gln | Asn | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Gly | Leu | Gly | Asp | Leu |
| | 275 | | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| Lys | Leu | Leu | Phe | Glu | Tyr | Leu | Thr | Leu | Phe | Gly | Ile | Asp | Asp | Lys | Ile |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| Ser | Phe | Asp | Leu | Ser | Leu | Ala | Arg | Gly | Leu | Asp | Tyr | Tyr | Thr | Gly | Val |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |
| Ile | Tyr | Glu | Ala | Val | Leu | Leu | Gln | Thr | Pro | Ala | Gln | Ala | Gly | Glu | Glu |
| | | | 325 | | | | | | 330 | | | | | 335 | |

[illegible]

<210> 94

<211> 497

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий С-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 94

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|------------|
| Met 1 | Gly | Ser | Ala | Glu 5 | Arg | Ala | Ala | Leu | Glu 10 | Glu | Leu | Val | Lys | Leu 15 | Gln |
| Gly | Glu | Arg | Val 20 | Arg | Gly | Leu | Lys | Gln 25 | Gln | Lys | Ala | Ser | Ala 30 | Glu | Leu |
| Ile | Glu | Glu | Glu | Val | Ala | Lys | Leu 40 | Leu | Lys | Leu | Lys | Ala 45 | Gln | Leu | Gly |
| Pro | Asp 50 | Glu | Ser | Lys | Gln | Lys | Phe 55 | Val | Leu | Lys | Thr 60 | Pro | Lys | Gly | Thr |
| Arg 65 | Asp | Tyr | Ser | Pro | Arg 70 | Gln | Met | Ala | Val | Arg 75 | Glu | Lys | Val | Phe | Asp 80 |
| Val | Ile | Ile | Arg | Cys 85 | Phe | Lys | Arg | His 90 | Gly | Ala | Glu | Val | Ile 95 | Asp | Thr |
| Pro | Val | Phe | Glu 100 | Leu | Lys | Glu | Thr 105 | Leu | Met | Gly | Lys | Tyr 110 | Gly | Glu | Asp |
| Ser | Lys | Leu 115 | Ile | Tyr | Asp | Leu | Lys 120 | Asp | Gln | Gly | Gly | Glu 125 | Leu | Leu | Ser |
| Leu 130 | Arg | Tyr | Asp | Leu | Thr | Val 135 | Pro | Phe | Ala | Arg | Tyr 140 | Leu | Ala | Met | Asn |
| Lys 145 | Leu | Thr | Asn | Ile | Lys 150 | Arg | Tyr | His | Ile | Ala 155 | Lys | Val | Tyr | Arg | Arg 160 |
| Asp | Asn | Pro | Ala | Met 165 | Thr | Arg | Gly | Arg | Tyr 170 | Arg | Glu | Phe | Tyr | Gln | Cys |
| Val | Asn | Asp | Arg 180 | Arg | Ile | Leu | Asp 185 | Gly | Met | Phe | Ala | Ile 190 | Cys | Gly | Val |
| Ser | Asp | Ser 195 | Lys | Phe | Arg | Thr | Ile 200 | Cys | Ser | Ser | Val 205 | Asp | Lys | Leu | Asp |
| Lys | Val 210 | Ser | Trp | Glu | Glu 215 | Val | Lys | Asn | Glu | Met | Val 220 | Gly | Glu | Lys | Gly |
| Leu | Ala | Pro | Glu | Val | Ala | Asp | Arg | Ile | Gly | Asp | Tyr | Val | Gln | Gln | His |

```

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

```

<210> 95

<211> 493

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-ТРНК-синтетазы, содержащий N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 95

```

Met His His His His His His Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu
 1          5          10          15
Gly Leu Asp Ser Thr Gly Ser Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu
          20          25          30
Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala
          35          40          45
Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys
          50          55          60
Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr
65          70          75          80
Pro Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys Leu Ile
          85          90          95
Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg Tyr Asp
          100          105          110
Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu Thr Asn
          115          120          125

```

```

Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn Pro Ala
130          135          140
Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe Asp Ile
145          150          155          160
Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu Lys Ile
          165          170          175
Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu Val Lys
          180          185          190
Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys Gly Val
          195          200          205
Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp
          210          215          220
Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu Lys Gly
225          230          235          240
Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln Gln His
          245          250          255
Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys Leu Ser
          260          265          270
Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu Leu Phe
          275          280          285
Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe Asp Leu
          290          295          300
Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr Glu Ala
305          310          315          320
Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu Gly Val
          325          330          335
Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly Met Phe
          340          345          350
Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile Gly Val
          355          360          365
Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu
          370          375          380
Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys
385          390          395          400
Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala
          405          410          415
Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn
          420          425          430
Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile
          435          440          445
Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr
          450          455          460
Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile
465          470          475          480
Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys Leu Glu
          485          490

```

<210> 96

<211> 493

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий С-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 96

```

Met Gly Ser Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln
1          5          10          15
Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu
          20          25          30
Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly

```


| | |
|-------|----------------------------------|
| <210> | 97 |
| <211> | 459 |
| <212> | Белок |
| <213> | Искусственная последовательность |

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 97

```

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

```

450

455

<210> 98

<211> 459

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-ТРНК-синтетазы, содержащий С-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 98

```

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

```

```

Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp
      405                      410                      415
Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln
      420                      425                      430
Pro Leu Cys Ile Cys Leu Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu
      435                      440                      445
Gly Leu Asp Ser Thr His His His His His
      450                      455

```

<210> 99

<211> 165

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 99

```

Met His His His His His His Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu
  1      5      10      15
Gly Leu Asp Ser Thr Gly Ser Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro
      20      25      30
Cys Val Gly Leu Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu
      35      40      45
Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln
      50      55      60
Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys
      65      70      75      80
Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr
      85      90      95
Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala
      100     105     110
Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly
      115     120     125
Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg
      130     135     140
Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
      145     150     155     160
Cys Ile Cys Leu Glu
      165

```

<210> 100

<211> 165

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий C-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 100

```

Met Gly Ser Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu
  1      5      10      15
Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu
      20      25      30
Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala
      35      40      45
Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu
      50      55      60
Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro

```

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65 | | 70 | | 75 | | 80 | | | | | | | | | |
| Lys | Leu | Leu | Asn | Gln | Leu | Gln | Tyr | Cys | Glu | Glu | Ala | Gly | Ile | Pro | Leu |
| | | | 85 | | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Val | Ala | Ile | Ile | Gly | Glu | Gln | Glu | Leu | Lys | Asp | Gly | Val | Ile | Lys | Leu |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Arg | Ser | Val | Thr | Ser | Arg | Glu | Glu | Val | Asp | Val | Arg | Arg | Glu | Asp | Leu |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Val | Glu | Glu | Ile | Lys | Arg | Arg | Thr | Gly | Gln | Pro | Leu | Cys | Ile | Cys | Leu |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Glu | Gly | Lys | Pro | Ile | Pro | Asn | Pro | Leu | Leu | Gly | Leu | Asp | Ser | Thr | His |
| 145 | | | | 150 | | | | | | 155 | | | | | 160 |
| His | His | His | His | His | | | | | | | | | | | |
| | | | | 165 | | | | | | | | | | | |

<210> 101

<211> 327

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид тистидил-тРНК-синтетазы

<400> 101

```

ggatcccgtgta ccaccgaaac ccaagttctg gttgcctcag ctcagaaaaa actgctggaa 60
gaacgcctga aactggtttag cgaactgtgg gatgctggca ttaaagccga actgctgtat 120
aaaaaaaaacc cgaaactgct gaatcagctg cagtattgtg aggaagcggg tattcctctg 180
gtggccatta tcggagaaca ggaactgaaa gacggcggtta ttaaactgcg tagcgtgacc 240
tctcgtgaag aagttgacgt tcgccgtgaa gatctggctg aggaaatcaa acgtcgtacc 300
ggatcaacctc tgtgtatttg cctcgag 327

```

<210> 102

<211> 1194

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид тистидил-тРНК-синтетазы

<400> 102

```

ggatccgcag aacgtgccgc cctggaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
ggtctgaaac agcagaaagc aagcgctgaa ctgatcgaag aagaagtggc gaaactgctg 120
aaactgaaag cacagctggg tcttgatgaa tcaaaacaaa aattcgctct gaaaactccg 180
aaagacttcg atattgccgg gaattttgac cctatgatcc ctgatgccga atgtctgaaa 240
atcatgtgtg agatcctgag cagtctgcag attggtgact tcttggtgaa agtgaacgat 300
cgccgtattc tggatggaat gtttgccatt tgtggcgtgt ctgacagcaa atttcgtacg 360
atctgtagca gcgtggataa actggataaa gtgagctggg aggaggtgaa aaatgagatg 420
gtgggcgaaa aaggtctggc acctgaagtg gctgaccgta tcggtgatta tgttcagcaa 480
catggcggtg tttctctggg cgaacagctg ctgcaagacc caaaactgag ccagaacaaa 540
caggcactgg aaggactggg tgatctgaaa ctgctgtttg agtatctgac gctgtttggc 600
atcgatgaca aaatctcggt tgacctgagc ctggcacgtg gtctggatta ttataccggc 660
gtgatctatg aagcgcgtct gctgcaaact ccagcacaag caggtgaaga acctctgggt 720
gttggtagtg tagcggcagg cggacgttat gatggactgg tggggatgtt tgatccgaaa 780
ggccgtaaag ttccgtgtgt cggctctgag atcgggggtg agcgtatctt tagcattgtg 840
gagcaacgtc tggaagctct ggaggaaaaa atccgtacca ccgaaacca agttctgggt 900
gcctcagctc agaaaaaact gctggaagaa cgccgtgaaac tgggttagcga actgtgggat 960
gctggcatta aagccgaact gctgtataaa aaaaacccga aactgctgaa tcagctgcag 1020
tattgtgagg aagcgggtat tctctgtgtg gccattatcg gagaacagga actgaaagac 1080
ggcgttatta aactgcgtag cgtgacctct cgtgaagaag ttgacgttcg ccgtgaagat 1140
ctggtcagag aaatcaaacg tcgtaccggg caacctctgt gtatttgcct cgag 1194

```

<210> 103

<211> 1086

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид тистидил-тРНК-синтетазы

<400> 103

```

ggatccgcag aacgtgccgc cctggaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
ggtctgaaac agcagaaagc aagcgcctgaa ctgatcgaag aagaagtggc gaaactgctg 120
aaactgaaag cacagctggg tctgatgaa tcaaaacaaa aattcgctct gaaaactccg 180
aaagtgaatg atcgccgtat cctggatggc atgtttgccca tttgtggtgt gagcgactcg 240
aaattccgta cgatttgctc tagcgtcgat aaactggaca aagtgtcctg ggaagagggtg 300
aaaaacgaga tgggtgggtga gaaagggtctg gctcctgaag ttgccgaccg tattgggtgat 360
tatgttcagc agcatggcgg tgtttcactg gttgaacaac tgctgcaaga cccgaaaactg 420
tctcagaata aacaggcgct ggaaggactg ggagatctga aactgctgtt tgagtatctg 480
accctgttcg gcattgatga caaaatcagc ttgcacctga gcctggcacg tggctctggat 540
tattataccg gcgtgatcta tgaagccgtt ctgctgcaga caccagcaca agcaggcgaa 600
gaacctctgg gtgttggttc tgtggcagcc ggtggctcgtt atgatggact ggtaggcatg 660
ttcgatccga aaggccgtaa agttccgtgt gtgggactga gtatcgggtg tgagcgtatc 720
tttagcatcg tggacaacg tctggaagcg ctggaggaga aaattcgtag caccgaaacc 780
caagttctgg ttgcctcagc tcagaaaaaa ctgctggaag aacgcctgaa actgggttagc 840
gaactgtggg atgctggcat taaagccgaa ctgctgtata aaaaaaaccg gaaactgctg 900
aatcagctgc agtattgtga ggaagcgggt attcctctgg tggccattat cggagaacag 960
gaactgaaag acggcgttat taaactgcgt agcgtgacct ctcgtgaaga agttgacgtt 1020
cgccgtgaag atctgggtcga ggaaatcaaa cgtcgtaccg gtcaacctct gtgtattttgc 1080
ctcgag                                     1086

```

<210> 104

<211> 1206

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид тистидил-тРНК-синтетазы

<400> 104

```

ggatccgcag aacgtgccgc cctggaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
ggtctgaaac agcagaaagc aagcgcctgaa ctgatcgaag aagaagtggc gaaactgctg 120
aaactgaaag cacagctggg tctgatgaa tcaaaacaaa aattcgctct gaaaactccg 180
aaaggaaactc gtgattatag cctcgccag atggctgtcc gtgaaaaagt gttcgatgtg 240
atcattcgct gcttcaaacg tcatggtgcc gaagtcattg ataccccggt gttcgagctg 300
aaagtgaacg atcgccgtat tctggatggc atgttcgccca tttgtggtgt tagcgatagc 360
aaattccgta caatctgctc tagcgtggac aaactggaca aagtgagctg ggaagagggtg 420
aaaaacgaga tgggtgggtga gaaaggcctg gctcctgaag ttgccgaccg tatcggagat 480
tatgttcagc agcatggcgg agtttcactg gttgaacaac tgctgcaaga cccgaaaactg 540
tctcagaaca aacaggcact ggaaggctcg ggagatctga aactgctgtt cgagtatctg 600
acgctgttcg gtattgacga caaaatttcc ttgcacctgt cgctggcacg tggctctggat 660
tattatacag gcgtgatcta tgaggctgta ctgctgcaga caccagcaca agcagggtgaa 720
gagcctctgg gtgttggttc agttgctgcc ggtggacgtt atgacggact ggtagggatg 780
tttgacccaa aaggccgtaa agtcccggtg gtaggactgt ctattggcgt tgagcgtatc 840
tttagcatcg tggagcaacg tctggaagct ctggaggaga aaatccgtac caccgaaacc 900
caagttctgg ttgcctcagc tcagaaaaaa ctgctggaag aacgcctgaa actgggttagc 960
gaactgtggg atgctggcat taaagccgaa ctgctgtata aaaaaaaccg gaaactgctg 1020
aatcagctgc agtattgtga ggaagcgggt attcctctgg tggccattat cggagaacag 1080
gaactgaaag acggcgttat taaactgcgt agcgtgacct ctcgtgaaga agttgacgtt 1140
cgccgtgaag atctgggtcga ggaaatcaaa cgtcgtaccg gtcaacctct gtgtattttgc 1200
ctcgag                                     1206

```

<210> 105

<211> 1428

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид гистидил-тРНК-синтетазы

<400> 105

```

ggatccgcag aacgtgccgc cctggaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
ggtctgaaac agcagaaagc aagcgcgtgaa ctgacgaaag aagaagtggc gaaactgctg 120
aaactgaaag cacagctggg tctgatgaa tcaaaacaaa aattcgctct gaaaactccg 180
aaaggaactc gtgattatag cctcgcgcag atggctgtcc gtgaaaaagt gttcgatgtg 240
atcattcgct gcttcaaacg tcatgggtgcc gaagtcattg ataccccggt gttcgagctg 300
aaagaaaccc tgatgggcaa atatggggaa gattccaaac tgatctatga cctgaaagac 360
cagggaggtg aactgctgtc tctgcgtat gacctgactg ttccttttgc tcgctatctg 420
gccatgaata aactgaccaa catcaaagcg tatcatatcg ccaaagtgtg tcgccgtgac 480
aatccagcaa tgaccctggg tcgttatcgt gaattttatc agtgtgtgaa cgatcgccgt 540
attctggacg gcatgttcgc catttgtggt gtgtctgact ccaaatttcg tacgatctgc 600
tcaagcgtgg acaactgga caaagtgagc tgggaagagg tgaaaaacga gatggtgggt 660
gagaaaggcc tggctcctga agttgccgac cgtatcggag attatgttca gcagcatggc 720
ggagtttcac tggttgaaca actgctgcaa gaccgaaac tgtcacagaa caaacaggca 780
ctggaaggtc tgggggatct gaaactgctg ttcgagtatc tgacgctgtt cggatttgac 840
gacaaaatca gcttcgatct gagcctggca cgtggtctgg actattatac cggcgtgatt 900
tatgaagccg ttctgctgca gactccagca caagcaggtg aagagcctct ggggtgttga 960
agtgtggcag ccggtggccg ttatgatggt ctggttggca tgtttgacct gaaaggccgt 1020
aaagtcccggt gtgtaggact gtctatcggc gtggagcgta tttttagcat cgtggaacaa 1080
cgcttggaag ctctggaaga gaaaatccgt accaccgaaa ccaagtctct ggttgccctca 1140
gctcagaaaa aactgctgga agaagcctg aaactggtta gcgaactgtg ggatgctggc 1200
attaaagccg aactgctgta taaaaaaaac ccgaaactgc tgaatcagct gcagtattgt 1260
gaggaagcgg gtattcctct ggtggccatt atcggagaac aggaactgaa agacggcggt 1320
attaaactgc gtagcgtgac ctctcgtgaa gaagttgacg ttcgccgtga agatctgggtc 1380
gaggaatca aacgtcgtac cggtaacct ctgtgtatct gcctcgag 1428

```

<210> 106

<211> 1416

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид гистидил-тРНК-синтетазы

<400> 106

```

ggatccgcag aacgtgccgc cctggaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
ggtctgaaac agcagaaagc aagcgcgtgaa ctgacgaaag aagaagtggc gaaactgctg 120
aaactgaaag cacagctggg tctgatgaa tcaaaacaaa aattcgctct gaaaactccg 180
aaagaaaccc tgatgggcaa atatggcgaa gattccaaac tgatctatga cctgaaagac 240
caaggcgggtg aactgctgtc cctgcgttat gacctgactg ttcggtttgc tcgttatctg 300
gccatgaata aactgaccaa cattaaacgc tatcacattg ccaaagtgtg tcgccgtgac 360
aatcctgcta tgactcgtgg acgttatcgt gaattctatc agtgtgactt cgatattgcc 420
ggcaactctc accctatgat tccggatgt gaattcctga aaatcatgtg tgagatcctg 480
agcagcctgc aaattggtga ctctcgtgtg aaagtgaatg accgtcgtat cctggatggc 540
atgttcgcca tttgtggtgt tagcgattcc aaattccgta ccatctgtag tagtgtggac 600
aaactggata aagtgagctg ggaagagggtg aaaaacgaaa tgggtgggcga aaaagggtctg 660
gcacctgagg ttgctgatcg tatcggtgac tatgtccagc agcatggagg tgtttcactg 720
gttgagcaac tgctgcaaga tccgaaactg tctcagaaca aacaggccct ggaaggactg 780
ggtgatctga aactgctgtt cgagtatctg acgtgttctg gtattgatga caaatctctg 840
ttcgacctgt ctctggctcg tggactggat tattatacgg gcgtaatcta tgaagctgtc 900
ctgctgcaga caccagcaca agcaggtgaa gagcctctgg gtgttggaaag tgttgctgcc 960
ggtggtcgct atgacggact ggttggcatg ttcgatccga aaggccgtaa agttccgtgt 1020
gtaggactga gcattggcgt tgagcgtatc ttttccatcg ttgagcaacg tctggaagca 1080
ctggaagaga aaatccgtac caccgaaacc caagttctgg ttgcctcagc tcagaaaaaa 1140
ctgctggaag aacgcctgaa actggttagc gaactgtggg atgctggcat taaagccgaa 1200
ctgctgtata aaaaaaaccc gaaactgctg aatcagctgc agtattgtga ggaagcgggt 1260
attcctctgg tggccattat cggagaacag gaactgaaag acggcggttat taaactgcgt 1320
agcgtgacct ctctgaaga agttgacgtt cgcgtgaaag atctggtcga ggaaatcaaa 1380
cgctgacctg gtcaacctct gtgtatttgc ctcgag 1416

```

<210> 107
 <211> 1314
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид тистидил-тРНК-синтетазы

<400> 107

```

ggatccgcag aacgtgccgc cctggaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
ggtctgaaac agcagaaagc aagcgctgaa ctgatacgaag aagaagtggc gaaactgctg 120
aaactgaaag cacagctggg tcctgatgaa tcaaaacaaa aattcgctct gaaaactccg 180
aaaggaactc gtgattatag ccctcgccag atggctgtcc gtgaaaaagt gttcgatgtg 240
atcattcgct gcttcaaacg tcatgggtgc gaagtcattg ataccccggt gttcgagctg 300
aaagatttcg atattgccgg caactttgat ccgatgattc cggatgctga gtgtctgaaa 360
atcatgtgtg agatcctgag tagtctgcag attggggatt tcctggtgaa agtgaacgat 420
cgccgtattc tggacggcat gtttgccatt tgtggcgtaa gcgatagcaa attccgtacg 480
atctgtagca gtgtggacaa actggataaa gtctcttggg aagaggtcaa aaacgagatg 540
gttggtgaga aaggcctggc tcctgaagtg gctgaccgta ttggtgatta tgtccagcag 600
catgggtgtg ttctactggt tgaacaactg ctgcaagacc cgaaactgtc tcagaacaaa 660
caggcactgg aaggtctggg tgatctgaaa ctgctgttcg agtatctgac gctgttcggg 720
attgacgaca aaatttcctt cgacctgtca ctggcacgtg gtctggatta ttatacaggc 780
gtaatctatg aggtgtact gctgcaaaact ccagcacaag caggtgaaga acctctggga 840
gttggttagtg tagcggcagg gggctcgttat gatgggctgg tcgggatgtt cgatccaaaa 900
ggccgtaaag tcccgtgtgt tggctctgtct attggcggtg agcgtatctt ctccatcgtg 960
gagcaacgtc tggaagctct ggaagaaaaa atccgtacca ccgaaacca agttctgggt 1020
gcctcagctc agaaaaaact gctggaagaa cgctgaaac tgggttagcga actgtgggat 1080
gttggcatta aagccgaact gctgtataaa aaaaaccgca aactgctgaa tcagctgcag 1140
tattgtgagg aagcgggtat tcctctggtg gccattatcg gagaacagga actgaaagac 1200
ggcgttatta aactgcgtag cgtgacctct cgtgaagaag ttgacgttcg ccgtgaagat 1260
ctggtcgagg aaatcaaacg tcgtaccggg caacctctgt gtatttgcct cgag 1314

```

<210> 108
 <211> 432
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид тистидил-тРНК-синтетазы

<400> 108

```

ggatccttcg acccaaaagg ccgtaaagtt ccgtgtgtag ggctgtctat cgggtgttgag 60
cgtatcttct ccatcgttga gcagcgtctg gaagcactgg aggaaaaaat ccgtacgacc 120
gagactcaag tcctgggttc tagtgcccag aaaaaactgc tggaaagagcg cctgaaactg 180
gttagtgagc tgtgggatgc cgggtattata gccgaactgc tgtataaaaa aaaccgcgaa 240
ctgtgaatc agctgcagta ttgtgaagaa gcgggcattc cgctggtagc gattatcggg 300
gaacaagaac tgaagatgg cgtgatcaaa ctgcgtagcg ttacaagccg tgaggaagtg 360
gacgtccgcc gtgaggatct ggttgaagag attaaacgcc gtacagggtca gcctctgtgt 420
atttgcctcg ag 432

```

<210> 109
 <211> 143
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 109

```

Cys Leu Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp
 1           5           10          15
Phe Leu Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala
          20          25          30
Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val
          35          40          45
Asp Lys Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val

```


| | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 50 | | 55 | | 60 | |
| Gly | Glu | Lys | Gly | Leu | Ala |
| 65 | | 70 | | 75 | |
| Val | Gln | Gln | His | Gly | Gly |
| | | 85 | | 90 | |
| Pro | Lys | Leu | Ser | Gln | Asn |
| | | 100 | | 105 | |
| Lys | Leu | Leu | Phe | Glu | Tyr |
| | | 115 | | 120 | |
| Ser | Phe | Asp | Leu | Ser | Leu |
| 130 | | 135 | | 140 | |

<210> 110
 <211> 429
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 110
 tgcctgaaga tcatgtgcga gatacctgagt tcaacttcaga taggcgactt cctgggtcaag 60
 gtaaacgata gacgcattct agatgggatg tttgctatct gtgggtgtttc tgacagcaag 120
 ttccgtacca tctgctcctc agtagacaag ctggacaagg tgtcctggga agaggtgaag 180
 aatgagatgg tgggagagaa gggccttgca cctgaggtgg ctgaccgcat tggggactat 240
 gtccagcaac atgggtgggt atccctgggtg gaacagctgc tccaggatcc taaactatcc 300
 caaaacaagc aggccttgga gggcctggga gacctgaagt tgctctttga gtacctgacc 360
 ctatttggca ttgatgacaa aatctccttt gacctgagcc ttgctcgagg gctggattac 420
 tacactggg 429

<210> 111
 <211> 168
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид гистидил-ТРНК-синтетазы, содержащий N-концевую аффинную метку 6xHis

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <400> 111 | | | | | | | | | | | | | | |
| Met | His | His | His | His | His | Gly | Lys | Pro | Ile | Pro | Asn | Pro | Leu | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Gly | Leu | Asp | Ser | Thr | Gly | Ser | Cys | Leu | Lys | Ile | Met | Cys | Glu | Ile |
| | | 20 | | | | | | 25 | | | | 30 | | |
| Ser | Ser | Leu | Gln | Ile | Gly | Asp | Phe | Leu | Val | Lys | Val | Asn | Asp | Arg |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | |
| Ile | Leu | Asp | Gly | Met | Phe | Ala | Ile | Cys | Gly | Val | Ser | Asp | Ser | Lys |
| | 50 | | | | | 55 | | | | 60 | | | | |
| Arg | Thr | Ile | Cys | Ser | Ser | Val | Asp | Lys | Leu | Asp | Lys | Val | Ser | Trp |
| 65 | | | | | 70 | | | | 75 | | | | | 80 |
| Glu | Val | Lys | Asn | Glu | Met | Val | Gly | Glu | Lys | Gly | Leu | Ala | Pro | Glu |
| | | | 85 | | | | | 90 | | | | 95 | | |
| Ala | Asp | Arg | Ile | Gly | Asp | Tyr | Val | Gln | Gln | His | Gly | Gly | Val | Ser |
| | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Val | Glu | Gln | Leu | Leu | Gln | Asp | Pro | Lys | Leu | Ser | Gln | Asn | Lys | Gln |
| | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Leu | Glu | Gly | Leu | Gly | Asp | Leu | Lys | Leu | Leu | Phe | Glu | Tyr | Leu | Thr |
| | 130 | | | | | 135 | | | | 140 | | | | |
| Phe | Gly | Ile | Asp | Asp | Lys | Ile | Ser | Phe | Asp | Leu | Ser | Leu | Ala | Arg |
| 145 | | | | | 150 | | | | 155 | | | | | 160 |
| Leu | Asp | Tyr | Tyr | Thr | Gly | Leu | Glu | | | | | | | |
| | | | | 165 | | | | | | | | | | |

<210> 112

<211> 168

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 112

```

Met Gly Ser Cys Leu Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln
 1           5           10           15
Ile Gly Asp Phe Leu Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly
          20           25           30
Met Phe Ala Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys
          35           40           45
Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn
          50           55           60
Glu Met Val Gly Glu Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile
65           70           75           80
Gly Asp Tyr Val Gln Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu
          85           90           95
Leu Gln Asp Pro Lys Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu
          100          105          110
Gly Asp Leu Lys Leu Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp
          115          120          125
Asp Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr
          130          135          140
Thr Gly Leu Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp
145          150          155          160
Ser Thr His His His His His His
          165

```

<210> 113

<211> 441

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид гистидил-тРНК-синтетазы

<400> 113

```

ggatcctgcc tgaaaatcat gtgtgagatc ctgagtagtc tgcaaattgg cgactttctg 60
gtcaaagtga acgatcgccg tattctggat ggcattgttc ccatctgtgg tgtagcgac 120
tccaaattcc gtacaatctg tagcagcgtg gacaaactgg ataaagtgtc ctgggaagag 180
gtgaaaaaac aaatggtggg tgaaaaaggt ctggctccgg aggttgctga ccgtatcggg 240
gattatgttc agcagcacgg cgggtgttagt ctgggtgaac aactgctgca agacccgaaa 300
ctgtctcaga acaaacaggc cctggaagga ctgggagatc tgaaactgct gttcgagtat 360
ctgacgctgt tcggcattga tgacaaaatt tctttcgacc tgtcactggc acgtggactg 420
gactattata ccggtctcga g                                     441

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Терапевтическая композиция для лечения воспалительного заболевания, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и изолированный полипептид аминоксил-тРНК-синтетазы (AARS), который по меньшей мере на 95, 98 или 100% идентичен последовательности SEQ ID NO: 64 или 83 или ее фрагменту, который представляет собой 100 или более смежных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 64 или 83, причем указанный полипептид имеет активность внеклеточной передачи сигнала, выбранную из модуляции высвобождения цитокинов, модуляции клеточной адгезии.

2. Терапевтическая композиция по п.1, где AARS полипептид слит с гетерологичным полипептидом, выбранным из группы, состоящей из меток аффинной очистки, эпитопных меток, нацеливающих последовательностей, сигнальных пептидов, последовательностей транслокации через мембрану и мо-

дификаторов фармакокинетических свойств (ПК).

3. Терапевтическая композиция по п.1, где аминокислотная последовательность AARS полипептида имеет по меньшей мере 98 или 100% идентичность последовательности SEQ ID NO: 64 или 83.

4. Изолированный полипептид AARS, аминокислотная последовательность которого имеет по меньшей мере 95, 98 или 100% идентичность последовательности SEQ ID NO: 64 или 83 или ее фрагменту, который представляет собой 100 или более смежных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 64 или 83, причем полипептид имеет активность внеклеточной передачи сигнала, выбранную из модуляции высвобождения цитокинов, модуляции клеточной адгезии.

5. Изолированный полипептид AARS по п.4, где AARS полипептид слит с гетерологичным полипептидом, выбранным из группы, состоящей из меток аффинной очистки, эпитопных меток, нацеливающих последовательностей, сигнальных пептидов, последовательностей транслокации через мембрану и модификаторов фармакокинетических свойств (ПК).

6. Изолированный полипептид AARS по п.4, где аминокислотная последовательность AARS полипептида имеет по меньшей мере 98 или 100% идентичность последовательности SEQ ID NO: 64 или 83.

7. Изолированный полипептид AARS по п.4, где к указанному полипептиду ковалентно или нековалентно присоединен по меньшей мере один фрагмент, где по меньшей мере один фрагмент представляет собой детектируемую метку или растворимый в воде полимер и где детектируемую метку выбирают из радиоизотопов, флуорохромов, красителей, ферментов, наночастиц, хемилюминесцентных маркеров.

8. Клеточная культура для рекомбинантной продукции полипептида AARS по любому из пп.4-6, содержащая популяцию клеток, в которой по меньшей мере одна клетка содержит и экспрессирует полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид AARS, и бессывороточную среду, причем указанные клетки способны расти в бессывороточной среде.

9. Вектор экспрессии, содержащий (i) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид AARS по любому из пп.4-6.

10. Способ идентификации соединения, которое специфично связывается с полипептидом AARS по любому из пп.4-6, включающий:

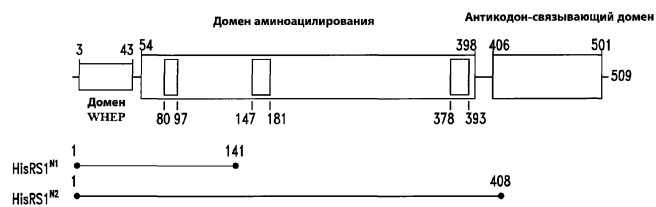
а) объединение полипептида AARS по меньшей мере с одним исследуемым соединением в подходящих условиях связывания и

б) детектирование связывания полипептида AARS с исследуемым соединением, с идентификацией соединения, которое специфично связывается с полипептидом AARS.

11. Способ лечения воспалительного заболевания путем введения полипептида AARS по любому из пп.4-6.

12. Способ по п.11, где воспалительным заболеванием является системный ювенильный артрит, системная красная волчанка, болезнь Крона и ревматоидный артрит.

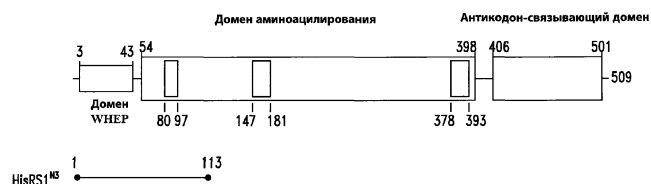
A



B

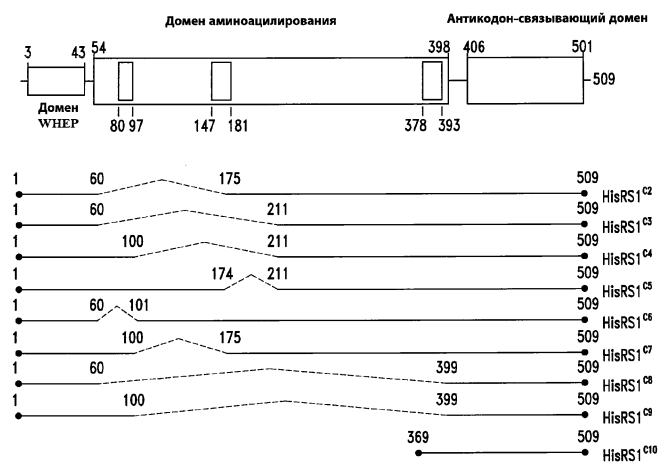


C

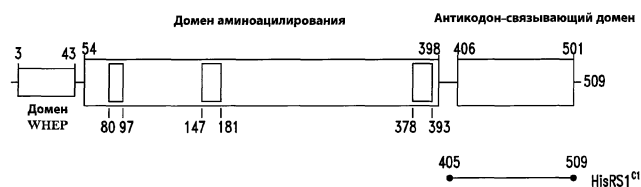


Фиг. 1

A



B



Фиг. 2

