

(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, ПОЛИПЕТИД 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)

(56) US-A1-20090227002

US-A1-20100028352

WO-A2-02059323

US-A1-20100093082

(72) Изобретатель:

Грин Лесли Энн, Чиан Кайл П., Хун
Фэй, Вассеро Аллен П. (US), Ло Винг-
Сизе (CN), Уоткинс Джейфри Д.,
Куинн Черил Л., Мендлен Джон Д.
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

030418

B1

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

B1

030418

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 аминоацил-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 аминоацил-тРНК-синтетазы (AARS) считаются важными белками "домашнего хозяйства" (housekeeping), которые катализируют аминоацилирование молекул тРНК в рамках процесса декодирования генетической информации в процессе трансляции белка. AARS интенсивно исследовались в этом аспекте, и многие из них 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 аминоацилированием, включая активность во внеклеточной передаче сигнала, модулирующую сигнальные пути не связанные 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 генной 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 мишени 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, биоинформационического 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 гистидиламиноацил-тРНК-синтетазы, с относительными положениями и размерами идентифицированных N-концевых полипептидов AARS, показанных схематически. На фиг. 1А представлены фрагменты, идентифицированные с помощью масс-спектрометрического анализа, на фиг. 1В представлены фрагменты, идентифицированные методом глубокого секвенирования транскриптомов, и на фиг. 1С представлены фрагменты, идентифицированные с помощью биоинформационического анализа.

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

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

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к терапевтической композиции для лечения воспалительного заболевания, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и изолированный полипептид аминоацил-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 аминоацил-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 аминоацил-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 аминоацил-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 аминоацил-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 аминоацил-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 аминоацил-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 аминоацил-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, общезвестных 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, гематопоэтические, 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 фрагмента 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. *stines*), 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 аминоацил-тРНК-синтетаз, несмотря на то, что канонические функции для всех аминоацил-тРНК-синтетаз необходимы в одинаковых участках в клетке и на относительно пропорциональном уровне. Не следует ожидать повышения уровня активности аминоацил-тРНК-синтетазы без одновременного повышения уровня других видов активности аминоацил-тРНК-синтетазы. Данные масс-спектрометрии и глубокого секвенирования указывают на то, что резектины аминоацил-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 аминоацил-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 ЕС₅₀ 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 фармакокинетических свойств (РК).

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 аминоацил-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 аминоацил-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 аминоацил-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 аминоацил-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 receptor может являться частью клетки, предпочтительно клетки, подходящей для выявления биологической активности резектина.

Конкретные варианты реализации изобретения включают клеточные композиции, содержащие изолированный белковый фрагмент аминоацил-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 аминоацил-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 receptor 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 аминоацил-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 receptor 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 аминоацил-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 аминоацил-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 аминоацил-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 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 аминоацил-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 аминоацил-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 связывает с изолированным белковым фрагментом аминоацил-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 эпиптомом, 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 аминоацил-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 аминоацил-тРНК-сингетазы (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 антисмысловой 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 различия его от контроля. Согласно конкретному варианту реализации изобретения образец и контроль включают клетку или ткань, и 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, 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 аминоацил-тРНК-сингетазы (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,angiогенеза, 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 angiогенеза, 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; с) необязательно оценку зависимости активности от структуры (structure-activity relationship, SAR) соединения, идентифицированного на этапе б), с соотнесением его структуры со способностью к модуляции неканонической активности, и, необязательно, дериватизацию соединения с изменением его способности модулировать неканоническую активность; и д) производство достаточного количества соединения, идентифицированного на этапе б) или дериватизация соединения, полученного на этапе с), 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 соотнесением его структуры с модуляющей неканонической активности, и, необязательно, дериватизацию соединения с изменением его способности модулировать указанную неканоническую активность; и д) 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 аминоацил-тРНК-синтетазы (AARS), где указанные клетки способны расти в бессырвоточной среде. Согласно одному аспекту, полноразмерный белок аминоацил-тРНК-синтетазы (AARS) содержит гетерологичную метку очистки или эпитопную метку, обеспечивающую облегчение очистки белкового фрагмента AARS. Согласно другому аспекту, полноразмерный белок аминоацил-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 аминоацил-тРНК-синтетазы (AARS) в клетке, причем указанная клетка содержит протеазу, способную расщеплять указанный гетерологичный полноразмерный белок аминоацил-тРНК-синтетазы (AARS) с получением полипептида AARS.

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

Некоторые варианты реализации изобретения включают модифицированный полноразмерный белок аминоацил-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 аминоацил-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 аминоацил-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 нукleinовой кислоты, кодирующей белковый фрагмент ARRS, 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-сингтетазы. 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, 25, 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, гидроксилизин, 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 ε-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 полуыведения 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 Meinhof, Vol. 5, p. 341, Academic Press, Inc., New York, N.Y. (1983), которые полностью включены в настоящее изобретение посредством ссылки. Другие примеры включают пералкилованные аминокислоты, в частности, перметилованные 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, нукleinовые 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-синтетаза" (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-синтетазы катализируют двухэтапную реакцию: во-первых, они активируют соответствующие аминокислоты путем образования аминоациладенилата, в котором карбоксил аминокислоты связывается с альфа-фосфатом АТФ путем замещения пироfosфата, и затем, когда связывается правильная тРНК, аминоацильная группа аминоациладенилата превращается в 2'- или 3'-концевой OH тРНК.

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

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

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

липолисахариды (LPS) или липоолигосахариды (LOS), обнаруживаемые в наружной мемbrane 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 пиrogенов, 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 устраниенным, риском присутствия эндотоксинов в композиции согласно изобретению. Предпочтительными являются способы производства полипептидов AARS в свободных от сыворотки клетках и изолирования 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 (Devereux 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 связанный 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, гематопоэза, нейрогенеза, миогенеза, остеогенеза и адипогенеза), модуляцию транскрипции генов, модуляцию апоптоза или других форм клеточной гибели, модуляцию клеточной передачи сигнала, модуляцию клеточного поглощения или секреции, модуляциюangiогенеза, 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 нукleinовой кислоты (например, A, T, C, G, I) или идентичный аминокислотный остаток (например, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tug, 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, проводятся 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 NWGap-DNA.CMP 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 нукleinовых 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 нукleinовой 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, Nucl. 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 гомогенный 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, мольяльности, 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 нукleinовых 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 "инtron" относится к некодирующему участку нукleinовой кислоты в гене, который не транслируется в белок. Некодирующие интранные 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 полноразмерных последовательностей, для которых известны только виды активности, связанные с аминоацилированием, 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 аминоацил-тРНК-синтетаз (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	MAERAALELVVLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLK TPKGTRDYSRQMAVREKVFVDIRCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLI YDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAM	SEQ ID NO: 12
HisRS1 ^{N1}	ДНК/Человек/	ATGGCAGAGCGTGCAGCCTGGAGGAGCTGGTAAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCAG GCCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTC CTGAAACTGAAGGCACAGCTGGTCCCTGATGAAAGCAAACAGAAATTGCTCAA ACCCCCAAGGGACAAGAGACTATAGTCCCCCGAGATGGCAGTTGCGAGAACGGTG TTTGACGTAATCATCCGTTGCTCAAGCGCACGGTGCAGAAGTCATTGATAACACCT GTATTTGAACAAAGAAACACTGATGGAAAGTATGGGAGACTCCAAGCTTATC TATGACCTGAAGGACCAGGGCGGGAGCTCCCTCGCTATGACCTCACTGTT CCTTTGCTCGGTATTTGGCAAT	SEQ ID NO: 13
HisRS1 ^{N2}	Белок/Человек/ 1-408	MAERAALELVVLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLK TPKGTRDYSRQMAVREKVFVDIRCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLI YDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYREF YQCDFDIAGNFDPMPIDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKNDRILDGFMFAICGVSD SKFRATICSSVDKLDKVSWEEVKNEMVGEKGLAPEVADRGDYVQQHGGVSLVEQLLQ DPKLSQNQKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVVIYEAVLLQ TPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPVCVGLSIGVERIFSIVEQRLEA LEEKIRRTTE	SEQ ID NO: 14
HisRS1 ^{N2}	ДНК/Человек/	ATGGCAGAGCGTGCAGCCTGGAGGAGCTGGTAAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCAG GCCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTC CTGAAACTGAAGGCACAGCTGGTCCCTGATGAAAGCAAACAGAAATTGCTCAA ACCCCCAAGGGACAAGAGACTATAGTCCCCCGAGATGGCAGTTGCGAGAACGGTG TTTGACGTAATCATCCGTTGCTCAAGCGCACGGTGCAGAAGTCATTGATAACACCT GTATTTGAACAAAGAAACACTGATGGAAAGTATGGGAGACTCCAAGCTTATC TATGACCTGAAGGACCAGGGCGGGAGCTCCCTCGCTATGACCTCACTGTT CCTTTGCTCGGTATTTGGCAATGAATAACTGACCAACATTAACGCTACCCACATA GCAAAGGTATATCGCGGGATAACCCAGCCATGACCCGTGGCGATACCGGAATT TACCAAGTGATTTGACATTGCTGGAACTTGTATCCCAGTATCCCTGATGCAGAG TGCCTGAAGATCATGTCGAGATCCTGAGTTCACTTCAGATAGGCAGTCCCTGGTC AAGGTAAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGTTGCTATCTGTTGTTCTGAC AGCAAGTCCGTACCATCTGCTCTCAGTAGACAAGCTGGACAAGGTGTCTGGAA GAGGTGAAGAATGAGATGGTGGAGAGAAGGGCTTGACCTGAGGTGGCTGACCGC ATTGGGACTATGTCAGCAACATGGTGGGTATCCCTGGTGGAAACAGCTGCTCCAG GATCCTAAACTATCCAAAACAAGCAGGCCCTGGAGGGCTGGAGACCTGAAGTTG CTCTTGAGTACCTGACCCATTGGCATTGATGACAAAATCTCCTTGACCTGAGC CTTGCTCGAGGGCTGGATTACTACACTGGGTGATCTATGAGGCAGTGCTGCTACAG ACCCCAGCCCAGGCAGGGGAAGAGCCCTGGTGTGGCAGTGTGGCTGCTGGAGGA CGCTATGATGGGCTAGTGGCATGTTGACCCCAAAGGGCGCAAGGTGCCATGTGTG GGGCTCAGCATTGGGTGGAGGGATTTCTCCATCGTGGACAGAGACTAGAGGCT 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	LLKLKAQLGQDEGKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDIRCFKR	SEQ ID NO: 17
Белок/мышь	HGAEVIDTPVFELK	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	ASAEQIEEEVTLLKLKAQLGQDEGKQKFVLTTPKGTRDYSRQMAVREKVFDTIRCFKRHGAEVIDTPV FELKETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLR	SEQ ID NO: 21

Таблица 1Д

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	ETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYR EFYQCDFDIAGQFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGNFLVKVNDRRIILDGMFAVCGVPDSDKFRТИCSSV DKLDKVSWEVKNEMVGEKGLAPEVADR	SEQ ID NO: 23
Белок/мышь	IGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPK	SEQ ID NO: 24

Таблица 1Е

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

Тип/вид	Последовательность	SEQ ID NO:
Белок/мышь	HGAEVIDTPVFELKETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTKRYHIAK VYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGNFLVKVNDRRIILDGMFA VCGVPDSKFRТИCSSVDKLDKVSWEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPK	SEQ ID NO: 25

Таблица 2А

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	MAERAALELVKLQGERVRLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFV LKTPK	SEQ ID NO: 26
HisRS1 ^{N4}	ДНК/Человек	ATGGCAGAGCGTGCGGCCTGGAGAGCTGGTAACTTCAGGGAGAGCGCGTGC GAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGTGGCAA ACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGTCCTGTGAAAGCAAACAGAAATTGTG CTCAAAACCCCCAAG	SEQ ID NO: 27
HisRS1 ^{N5}	Белок/Человек/ 1-243+27aa	MAERAALELVKLQGERVRLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFV LKTPKGRDYSRQMAVREKVFDTIRCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGED SKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTKRYHIAKVYRRDNPAMTR GRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVNDRRIILDGM FAICGVSDSKFRТИCSSVDKLDKVGYPPWNNSCSRILNPKTSRPRAWET	SEQ ID NO: 28
HisRS1 ^{N5}	ДНК/Человек	ATGGCAGAGCGTGCGGCCTGGAGAGCTGGTAACTTCAGGGAGAGCGCGTGC GAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGTGGCAA ACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGTCCTGTGAAAGCAAACAGAAATTGTG CTCAAAACCCCCAAGGGCACAAAGAGACTATAAGTCCCAGGAGCTGGCAGTCGCG AGAAGGTGTTGACGTAATCATCCGTTGCTTAAGCAGGCCACGGTGCAGAAGTCAT TGATACACCTGTATTGAACTAAAGGAAACACTGATGGGAAAGTATGGGAAAGAC TCCAAGCTTATCATGACCTGAAGGACCAGGGGGAGCTCTGTCCCTCGCT ATGACCTCACTGTTCTTTGCTCGGTATTTGCAATGAATAACTGACCAACAT	SEQ ID NO: 29
		TAAACGCTACCATAGCAAAGGTATATCGCGGGATAACCCAGCCATGACCGT GGCGCATACCGGAATTCTACCACTGTGATTGACATTGCTGGAACTTGATC CCATGATCCCTGATGCAGAGTGCCTGAAGATCATGTGCGAGATCCTGAGTCACT TCAGATAGGCAGACTCCCTGGTCAAGGTAACAGATCGACGCATTCTAGATGGGATG TTGCTATCTGTTGCTGACAGCAAGTCCGTACCATCTGCTCCTCAGTAG ACAAGCTGGACAAGGTGGGTATCCCTGGTGAACAGCTGCTCCAGGATCCTAA CTATCCAAAACAAGCAGGCCCTGGAGGGCTGGGAGACCTGA	

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/	GAAATTTGTGCTAAAACCCCAAG TAGAGACGAGGTTTACCATGTTGG	SEQ ID NO: 30
	Белок/Человек	KFVLKTPK	SEQ ID NO: 31
H1-AS05	ДНК/Человек/	CTCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAG GTGGGGTATCCCTGGTGGAACAGCT	SEQ ID NO: 32
	Белок/Человек	SSVDKLDKVGVYPWWNS	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	MAERAALELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKF VLKTPKGTRDYSRQMAVREKFDVIIRCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMKGY EDSKL	SEQ ID NO: 34
HisRS1 ^{N3}	ДНК/Человек	ATGGCAGAGCGTGCAGCGCTGGAGAGCTGGTCAAACCTTCAGGGAGAGCGCGTG CGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGGAGGTGGCG AAACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGTCCTGATGAAAGCAACAGAAATT GTGCTCAAAACCCCAAGGGCACAAAGAGACTATAGTCCCCGGCAGATGGCAGTT CGCGAGAAGGTGTTGACGTAATCATCCGTTCAAGCGGCCAGGTGAGAA GTCATTGATAACACCTGTATTGAACTAAAGGAAACACTGATGGAAAGTATGGG GAAGACTCCAAGCTT	SEQ ID NO: 35

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

Таблица 4А

Полипептиды AARS, идентифицированные с помощью МС

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	MAERAALELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFV LTKTPKDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKNDRRIILDGMFAICGV SDSKFRATICSSVDKLDKVSWEEVKNEMVGEKGLAPEVADRGDYVQQHGGVSLVEQ LLQDPKLSQNPKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSSLARGLDYYTGVIYE VLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKPCVGGLSIGVERIFSIVE QRLEALEEKIRTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAEALLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPL CIC	SEQ ID NO: 48

		ATGGCAGAGCGTGC GGCGCTGGAGGAGCTGGTAAACTCAGGGAGAGCGCGTGCG AGGCCCTCAAC CAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGGTGGCGAAAC TCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTGTGCTC AAAACCCCCAAGGATTTGACATTGCTGGAACTTGATCCCAGATCCCAGTGC AGAGTGCCTGAAGATCATGTGCGAGATCTGAGTTCACTTCAGATAGGGCAGTTCC TGGTCAAGGTAACAGATCGACGCATTCTAGATGGGATGTTGCTATCTGTGGTGT TCTGACAGCAAGTTCCTGACCATCTGCTCTCAGTAGACAAGCTGGACAAG CCTGAAGTTGCTTTGAGTACCTGACCCATTGGCATTGATGACAAAATCTCCT TTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTACACTGGGTGATCTATGAGGCA GTGCTGCTACAGACCCCCAGGCCAGGCAAGGGGAAGAGCCCTGGGTGGCAGTGT GGCCTGCTGGAGGACGCTATGATGGCTAGTGGCATGTTGACCCAAAGGGCGCA AGGTGCCATGTGTTGGGCTCAGCATTGGGTGGAGCGGATTTCTCATCGTGGAA CAGAGACTAGAGCTTGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGT GGCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCTGTCTCAGAACTGT GGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCCAAAGCTACTGAAC CAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCACTGGTGGCTATCATCGGCGAGCA GGAACACTAAGGATGGGCTCATCAAGCTCGTTCACTGAGCAGCAGGGAGAGGTGG ATGTCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAAAGAGAACAGGCAGCCCTC TGCATCTGCTGA	SEQ ID NO: 49
HisRS1 ^{C2}	ДНК/Человек	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEVAKLKLKAQLGPDESKQKFVL KTPVNDRRI LDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEEVKNEMVGEKGLAPE VADRIDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNQKALEGLDLKLLFEYLTLFGIDDKI SF DLSLARGLDYYTGVIVYEAVL LQTPAQAGEEPLGVGVSAAGGRYDGLVGMFDPKG RKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEAEEKIRTTETQVILVASAQKKLLEERLKLVSE LWDAGIKAE LLYKKNP KLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLR SVTSREE VDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	SEQ ID NO: 50
HisRS1 ^{C3}	Белок/ человек/ 1-60+211-509	ATGGCAGAGCGTGC GGCGCTGGAGGAGCTGGTAAACTCAGGGAGAGCGCGTGCG AGGCCCTCAAC CAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGGTGGCGAAAC TCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTGTGCTC AAAACCCCCAAGGTAACAGATCGACGCATTCTAGATGGGATGTTGCTATCTGTGG TGTCTGACAGCAAGTCCCTGACCATCTGCTCTCAGTAGACAAGCTGGACAAGG GTGCTGACCCGATTGGGACTATGTCAGCAACATGGTGGGTATCCCTGGTGG ACAGCTGCTCAGGATCTAAACTATCCAAAACAAGCAGGCCCTGGAGGGCTGG GAGACCTGAAGTTGCTTTGAGTACCTGACCCATTGGCATTGATGACAAAATC TCCTTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTACACTGGGTGATCTATGA GGCAGTGCTGCTACAGACCCCCAGGCCAGGCAAGGGGAAGAGCCCTGGGTGG GTGCTGCTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGCATGTTGACCCAAAGGG CGCAAGGTGCCATGTGTTGGGCTCAGCATTGGGTGGAGCGGATTTCTCCATCGT GGAACAGAGACTAGAGCTTGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGC TTGTGGCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCTGTCTCAGAA CTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCCAAAGCTACT	SEQ ID NO: 51
HisRS1 ^{C3}	ДНК/Человек		

		GAACCAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCCACTGGTGGCTATCATCGCG AGCAGGAACCTCAAGGATGGGTCATCAAGCTCCGTTCACTGACGAGCAGGGAAAGAG GTGGATGTCCGAAGAGAACCTTGTGGAGGAATCAAAGGAGAACAGGCCAGCC CCTCTGCATCTGCTGA	
HisRS1 ^{c4}	Белок/ человек/ 1-100+211- 509	MAERAALELVQLQGERVRGLKQQKASAEELIEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVL KTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVIIRCFKRHGAEVIDTPVFEVKVNDRRILDGMFA ICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEEVKNEMVGEKGLAPEVADRGDYVQQHGGVS LVEQLLQDPKLSQNQKALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGV IYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKRKVPVCVGLSIGVERIF SIVEQRLEALEEKIRTTEQVLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKABELLYKKNP KLLNQLQYCEEAGIPLVATIIGEQUELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRT GQPLCIC	SEQ ID NO: 52
HisRS1 ^{c4}	ДНК/Человек	ATGCCAGAGCGTGCAGCGCTGGAGGAGCTGGTAAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCG AGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGGTGGCGAAAC TCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGTGAAAGCAAACAGAAATTGTGCTC AAAACCCCCAAGGGCACAAAGAGACTATAGTCCCAGGAGATGGCAGTCGCGAGAA GGTGTGAGCTTAATCATCCGTTGCTTCAGCGCCACGGTGCAGAAGTCATTGATA CACCTGTATTGAACTAAAGGTAACAGATCGACGCATTCTAGATGGGATGTTGCT ATCTGTGGTGTCTGACAGCAAGTCCGTACCATCTGCTCCTCAGTAGACAAGCT GGACAAGGTGTCTGGGAGAGGTGAAGAATGAGATGGTGGAGAGAAGGGCTTG CACCTGAGGTGGCTGACCGCATTGGGACTATGTCAGCAACATGGGGGTATCC CTGGTGGAACAGCTGCTCAGGATCCTAAACTATCCAAAACAAGCAGGCCCTGGA GGGCTGGAGACCTGAAGTTGCTTTGAGTACCTGACCTATTGGCATTGATG	SEQ ID NO: 53
		ACAAAATCTCTTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTACACTGGGTG ATCTATGAGGCAGTGCTGCTACAGACCCCCAGGCCAGGCAGGGAAAGAGCCCTGGG TGTGGCAGTGCTGGCTGCTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGGATGTTGACC CCAAAGGGCGCAAGGTGCATGTGTTGGCTCAGCATTGGGTGGAGCGGATTTC TCCATCGTGAACAGAGACTAGAGGTTGGAGGAGAAGATACGGACACGGAGAC ACAGGTGCTGTGGCATCTGCACAGAAGAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCTTG TCTCAGAACTGTGGGATGCTGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCA AAGTACTGAACCAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCACTGGTGCCTAT CATCGCGAGCAGGAACCTCAAGGATGGGCTCATCAAGCTCCGTTCACTGACGAGCA GGGAAGAGGTGGATGTCGAAGAGAACCTTGTGGAGGAATCAAAGGAGAACAA GGCCAGCCCCCTGCTGACATCTGCTGA	
HisRS1 ^{c5}	Белок/ человек/ 1-174+211- 509	MAERAALELVQLQGERVRGLKQQKASAEELIEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVL KTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVIIRCFKRHGAEVIDTPVFEVKVNDRRILDGMKYGEDSK LIYDLKDQGGELLSRLYDLTVFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRY REFYQCVNDRRILDMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEEVKNEMVGEKGLA PEVADRGDYVQQHGGVSVEQLLQDPKLSQNQKALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDD KISFDLSLARGLDYYTGVYIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDP KGRKVPVCVGLSIGVERIF SIVEQRLEALEEKIRTTEQVLVASAQKKLLEERLKLV SELWDAGIKABELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQUELKDGVIKLRSVTSR EEVDVRREDLVEEIKRTGQPLCIC	SEQ ID NO: 54

		ATGGCAGAGCGTGC GGCGCTGGAGGAGCTGGTAAACTCAGGGAGAGCGCGTGCG AGGCCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGGTGGCGAAAC TCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTGTGCTC AAAACCCCCAAGGGCACAAAGAGACTATAGTCCC CGCAGATGGCAGTCGCAGAA GGTGTGAGCTAATCATCGTTGCTTCAGCGCCACGGTGCAGAAGTCATTGATA CACCTGTATTGAAC TAAAGGAAACACTGATGGAAAGTATGGGAAGACTCCAAG CTTATCTATGACCTGAAGGACCAGGGGGGGAGCTCTGTCCCTCGCTATGACCT CACTGTTCTTTGCTCGTATTGGCAATGAATAAACTGACCAACATTAACGCT ACCATAGCAAAGGTATATCGCGGGATAACCCAGCAGTCAGCCGGATAAC CGGGAAATTCTACCACTGTTGAAAGCAGTCAGCATTCTAGATGGGATTTGCTAT CTGTGGTGTCTGACAGCAAGTCCGTAACCTGACCTCTGCTCAGTAGACAAGCTGG ACAAGGTGCTGGAGGGTGAAGAATGAGATGGGGAGAGAAGGGCCTGCA CCTGAGGTGCTGGAGGGACTATGTCAGCAACATGGGGTATCCCT GGTGAACAGCTGCTCCAGGATCCTAACTATCCAAAACAAGCAGGGCTGGAGG GCCTGGGAGACCTGAAGTGCTCTTGAGTACCTGACCCATTGGCATTGATGAC AAAATCTCTTGACCTGAGCCTGAGCCTGCTGAGGGCTGGATTACTACACTGGGTGAT CTATGAGGCACTGCTACAGACCCAGCCAGGGAGAGCCCCTGGGTG TGGGAGGTGCTGCTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGGATGTTGACCCCC AAAGGGCGCAAGGTGCATGTGTTGGCTCAGCATTGGGGTGGAGCGGATTTC CATCGTGGAACAGAGACTAGAGGCTTGAGGAGAAGATA CGGACACGGAGACAC AGGTGCTTGCGATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAGACTAAAGCTGTC TCAGAACTGTGGGATGCTGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCAA GCTACTGAACCAGTTACAGTACTGTGAGGGAGGCATCCACTGGGGCTATCA	SEQ ID NO: 55
		TCGGCGAGCAGGA ACTCAAGGATGGGT CATCAAGCTCGTTCAGTGAGCAGCAGG GAAGAGGTGGATGTCGAAGAGAAGACCTTGAGGAGAAATCAAAGGAGAACAGG CCAGCCCTCTGCATCTGCTGA	
HisRS1 ^{C6}	Белок/ человек/ 1-60+101-509	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEVAKLLKLKAQLGPDESKKFVL KTPKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSRYDLTVFARYLAMNKLNTKRYHI AKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFL VKVNDRRI LDGMFAICGVSDSKFR TICSSVDKLDKVSEEVVNEMVGEKGLAPEVA DRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNQALEGLD LKLLFEYLTLFGIDDKISF DL SLAR GLDYYTGVIYEAVL LQTPAQAGEEPLVGVSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRK VPCVGLSIGVERIF SIVEQRL EALEEKIRTTETQVLVASAQKKLEERLKLVSELW DAGIKAE LLYKKNP KLLNQLQYCEEAGIPLV AII GEQELKDGVIKLR SVTSREEVD VRRE DLVEEIKRRTGQPLCIC	SEQ ID NO: 56
HisRS1 ^{C6}	ДНК/Человек	ATGGCAGAGCGTGC GGCGCTGGAGGAGCTGGTAAACTCAGGGAGAGCGCGTGCG AGGCCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGGTGGCGAAAC TCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTGTGCTC AAAACCCCCAAGGGCACAAAGACTGATGGAAAGTATGGGAAGACTCCAAGCTTATCTA TGACCTGAAGGACCAGGGGGAGCTCTGTCCCTCGCTATGACCTCACTGTT CTTTGCTCGT ATTGGCAATGAATAAACTGACCAACATTAACGCTACACATA GCAAAGGTATATCGCGGGATAACCCAGCAGTCAGCCGATACCGGGATT CTACCA GTGATTTGACATTGCTGGGAACTTTGATCCCATGATCCCTGATGCAG AGTGCCTGAAGATCATGTCGAGATCTGAGTTCACTTCAGATAGGCAGTTCTG GTCAAGGTAAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGTTGCTATCTGTTGTT TGACAGCAAGTCCGTACCATCTGCTCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAGGTGCTC	SEQ ID NO: 57

		GGGAAGAGGTGAAGAATGAGATGGTGGAGAGAAGGGCCTTGACCTGAGGTGGCT GACCGCATTGGGACTATGTCAGCAACATGGTGGGTATCCCTGGTGGACAGCT GCTCCAGGATCTAACTATCCAAAACAAGCAGGCCTTGGAGGGCTGGAGACC TGAAGTTGCTCTTGAGTACCTGACCCATTGGCATTGATGACAAAATCTCCTT GACCTGAGCCTGCTCAGGGCTGGATTACTACACTGGGTGATCTATGAGGCAGT GCTGCTACAGACCCCAGGCCAGGGAGAGCCCTGGGTGTGGCAGTGTGG CTGCTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGCATGTTGACCCCAAAGGGCGCAAG GTGCATGTGTTGGCTCAGCATTGGGGTGGAGCGGATTTCTCATCGTGGAAACA GAGACTAGAGGCTTGGAGGAGAAGATAAGGACACAGGAGACACAGGTGCTGTGG CATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCTGTCTAGAACTGTGG GATGCTGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCAAAGCTACTGAACCA GTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCACTGGTGCTATCATCGCGAGCAGG AACTCAAGGATGGGTCATCAAGCTCCGTTCACTGACGAGCAGGGAAAGGGTGGAT GTCCGAAGAGAACCTTGTGGAGGAAATCAAAGAGAACAGGCCAGCCCTCTG CATCTGCTGA	
HisRS1 ^{c7}	Белок/ Человек/ 1-100+ 175-509	MAERAALELVQLQGERVRGLKQQKASAELIEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVL KTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAEVIDTPVFEKDFDIAGNFPMI PDAECLKIMCEILSSLQIQGDFLVKVNDRRIILDGMFAICGVSDSKFRТИCSSVDKLD KVSWEVKNEMVGEKGLAPEVADRGIDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNQALEG LGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDYVTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGV GSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPVCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEKIRTETQ VLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAEELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAI GEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRTGQPLCIC	SEQ ID NO: 58
HisRS1 ^{c7}	ДНК/Человек	ATGGCAGAGCGCTGCGGCCCTGGAGGAGCTGGTGAACACTCAGGGAGAGCGCGTGCG AGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCAGCTGATCGAGGAGGAGTGGCGAAC TCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGTCTGTGATGAAAGCAAACAGAAATTGTGCTC AAAACCCCCAAGGGCACAAAGAGACTATAGTCCCGCAGATGGCAGTCGCGAGAA GGTGTGTTGACGTAATCATCCGTTGCTTCAGCGCCACGGTGCAGAAGTCATTGATA CACCTGTATTGAACTAAAGGATTTGACATTGCTGGAACTTTGATCCATGATC CCTGATGCAGAGTGCCTGAAGATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCACTTCAGATAGG CGACTTCCTGGTCAAGGTAACAGTCAGCGCATTCTAGATGGGATGTTGCTATCT GTGGTGTGTTCTGACAGCAAGTCCGTTGACGTCAGTAGACAAGCTGGAC AAGGTGTCTGGGAAGAGGTGAAGAATGAGATGGTGGGAGAGAACGGGCTTGCACC TGAGGGTGGCTGACCGCATGGGACTATGTCCAGCACATGGTGGGTATCCCTGG TGGAACAGCTGCTCCAGGATCTAAACTATCCAAAACAAGCAGGCCCTGGAGGGC CTGGGAGACCTGAAGTTGCTTTGAGTACCTGACCCATTGGCATTGATGACAA AATCTCTTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTACACTGGGTGATCT ATGAGGCAGTGCCTGCTACAGACCCCAGCCAGGCAGGGAAAGAGCCCTGGGTGTG GGCACTGTGGCATCTGCACAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCTGTCTC AGAAGCTGTGGATGCTGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCAAAGC TACTGAACCAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCACTGGTGGCTATCATC GGCGAGCAGGAACTCAAGGATGGGTATCAAGCTCCGTTCACTGACGAGCAGGG AGAGGTGGATGTCGAAGAGAACCTTGTGGAGGAAATCAAAGAGAACAGGCC AGCCCTCTGCATCTGCTGA	SEQ ID NO: 59

HisRS1 ^{c8}	Белок/ человек/ 1-60+399-509	MAERAALELVQLQGERVRLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVL KTPKALEEKIRTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAEILYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGEQUELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPL CIC	SEQ ID NO: 60
HisRS1 ^{c8}	ДНК/Человек	ATGGCAGAGCGTGC CGCCTGGAGGAGCTGGTCAAACCTCAGGGAGAGCGCGTGCG AGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAC TCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGCTCTGATGAAAGCAAACAGAAAATTGTGCTC AAAACCCCCAAGGGTTGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGCACAGGTGTTGT GGCATCTGACAGAAGAGCTCTAGAGGAAAGACTAAAGCTGTCTCAGAACTGT GGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCCAAAGCTACTGAAC CAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCCCTGTTGCTATCATCGCGAGCA GGAACCTCAAGGATGGGTATCAAGCTCCGTTAGTGACGAGCAGGGAAAGAGGTGG ATGTCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAAAGGAGAACAGGCCAGCCCCCTC TGCATCTGCTGA	SEQ ID NO: 61
HisRS1 ^{c9}	Белок/ человек/ 1-100+399- 509	MAERAALELVQLQGERVRLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVL KTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIIIRCFKRHGAEVIDTPVFELKALEEKIRTETQ VLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAEILYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAI IIGEQUELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	SEQ ID NO: 62
HisRS1 ^{c9}	ДНК/Человек	ATGGCAGAGCGTGC CGCCTGGAGGAGCTGGTCAAACCTCAGGGAGAGCGCGTGCG AGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAC TCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGCTCTGATGAAAGCAAACAGAAAATTGTGCTC AAAACCCCCAAGGGACAAGAGACTATAGCTCCCGCAGATGGCAGTCGCGAGAA GGTGTGTTGACGTAATCATCCGTTGCTCAAGCGCCACGGTGCAGAAGTCATTGATA	SEQ ID NO: 63
		CACCTGTATTGAACTAAGGTTGGAGGAGAAGATAACGGACCACGGAGACACAG GTGCTTGTGGCATCTGCACAGAAGAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCTGTCTC AGAACTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCCAAAGC TACTGAACCACTTAACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCCCTGTTGCTATCATC GGCGAGCAGGAACCTCAAGGATGGGTATCAAGCTCCGTTAGTGACGAGCAGGG AGAGGTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAAAGGAGAACAGGCC AGCCCCCTCTGCATCTGCTGA	
HisRS1 ^{c10}	Белок/ человек/ 369-509	MFDPKGRKVPVGGLSIGVERIFSIVERQRLEALEEKIRTETQVLVASAQKKLLEER LKLVSELWDAGIKAEILYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQUELKDGVIKLRS VTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	SEQ ID NO: 64
HisRS1 ^{c10}	ДНК/Человек	ATGTCGACCCCAAAGGGCGCAAGGTGCCATGTGTTGGGCTCAGCATTGGGTGGA GCGGATTTCTCCATGTGGAACAGAGACTAGAGGCTTGGAGGAGAAGATACGG CCACGGAGACACAGGTGCTTGTGGCATTGACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGA CTAAAGCTTGTCTCAGAACACTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAA GAAGAACCCAAAGCTACTGAACCACTGAGCTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCCAC TGGTGGCTATCATCGCGAGCAGGAACCTCAAGGATGGGTATCAAGCTCCGTTCA GTGACGAGCAGGGAAAGAGGTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAA AAGGAGAACAGGCCAGCCCCCTGCATCTGCTGA	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	GAAATTTGTGCTAAAACCCCAAG GATTTGACATTGCTGGAACTTTG	SEQ ID NO: 66
	Белок/ Человек	KFVLKTPKDFDIAGNF	SEQ ID NO: 67
H1-AS02	ДНК/ Человек	GAAATTTGTGCTAAAACCCCAAG GTAAACGATCGACGCATTCTAGATG	SEQ ID NO: 68
	Белок/ Человек	KFVLKTPKVNDRRILD	SEQ ID NO: 69
H1-AS03	ДНК/ Человек	TGATACACCTGTATTGAECTAAAG GTAAACGATCGACGCATTCTAGATG	SEQ ID NO: 70
	Белок/ Человек	DTPVFELKVNDRRILD	SEQ ID NO: 71
H1-AS07	ДНК/ Человек	CCGATACCGGAATTCTACCAAGTGT GTAAACGATCGACGCATTCTAGATG	SEQ ID NO: 72
	Белок/ Человек	RYREFYQCVNDRRILD	SEQ ID NO: 73
H1-SV04	ДНК/ Человек	GAAATTTGTGCTAAAACCCCAAG GAAACACTGATGGAAAGTATGGGG	SEQ ID NO: 74
	Белок/ Человек	KFVLKTPKETLMGKYG	SEQ ID NO: 75
H1-SV10	ДНК/ Человек	TGATACACCTGTATTGAECTAAAG GATTTGACATTGCTGGAACTTTG	SEQ ID NO: 76
	Белок/ Человек	DTPVFELKDFDIAGNF	SEQ ID NO: 77
H1-SV11	ДНК/ Человек	GAAATTTGTGCTAAAACCCCAAG GCCTTGAGGAGAAGATAACGGACCA	SEQ ID NO: 78
	Белок/ Человек	KFVLKTPKALEEKIRT	SEQ ID NO: 79
H1-SV14	ДНК/ Человек	TGATACACCTGTATTGAECTAAAG GCCTTGAGGAGAAGATAACGGACCA	SEQ ID NO: 80
	Белок/ Человек	DTPVFELKALEEKIRT	SEQ ID NO: 81
H1-AS05	ДНК/ Человек	CTCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAG GTGGGGTATCCCTGGTGAACAGCT	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	RTTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIP LVAIIIGEQUELDGVIVLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	SEQ ID NO: 83
HisRS1 ^{c1}	ДНК/ Человек/	CGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGTGGCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAA AGACTAAAGCTTGTCTCAGAACTGTGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTAC AAGAAGAACCAAAGCTACTGAACCAAGTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCCA CTGGTGGCTATCATCGCGAGCAGGAACCTCAAGGATGG GTCATCAAGCTCCGTTCAAGTGACGAGCAGGGAGAGGTTGATGTCCGAAGAGAAC CTTGAGGAGGAAATCAAAAGGAGAACAGGCCAGCCCCTGCTGATCTGCTGA	SEQ ID NO: 84

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

Таблица 7А

Полипептиды AARS, идентифицированные с помощью МС

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

Таблица 7В

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

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

Таблица 7С

Составленные последовательности на основе выявленных с помощью масс-спектрометрии пептидов

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

Таблица 8А

Полипептиды AARS и альтернативные транскрипты, идентифицированные методом глубокого секвенирования

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

Таблица 8В

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	CLKIMCEILSSLQIQLDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRATICSSVDKLDKVSW EEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNQALEGLGDL KLLFEYLTFLGIDDKISFDSLARGLDYYTG	SEQ ID NO: 109
HisRS1 ¹¹	ДНК/Человек	TGCCTGAAGATCATGTGCGAGATCCTGAGATTCACTTCAGATAAGGCACCTCTGGT CAAGGTAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGTTGCTATCTGTGGTGTCTG ACAGCAAGTCCGTACCATCTGCTCCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAGGTGTCTGG GAAGAGGTGAAGAATGAGATGGTGGGAGAGAACGGGCCTGCACCTGAGGTGGCTGA CCGCATTGGGACTATGTCAGCAACATGGTGGGTATCCCTGGTGGAACAGCTGC TCCAGGATCTAACTATCCAAAACAAGCAGGCCCTGGAGGGCCTGGGAGACCTG AAGTTGCTTTGAGTACCTGACCCTATTGGCATTGATGACAAAATCTCCTTGA CCTGAGCCTGCTCGAGGGCTGGATTACTACACTGGG	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, мембранный, 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, ризопупспепсин, 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 субстилизинов, которое включает бактериальные ферменты, такие как субстилизин. Общая трехмерная структура различается между указанными двумя классами, но они имеют одинаковую геометрию активного сайта, и катализ проходит по одному 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 бромелайн, некоторые лизосомальные катепсины млекопитающих, цитозольные кальпаины (кальций-активируемые), также как и некоторые протеазы паразитов (например, *Trypanosoma*, *Schistosoma*). Папаин представляет собой архетипический 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 отличаются 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, серализин).

Типичные протеазы включают, например, ахромопептидазу, аминопептидазу, анкрод, ангиотензин-превращающий фермент, бромелайн, 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, клостропапаин, 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 Xa, фицин, фурин, гранзим А, гранзим В, протеазу ВИЧ, IGa3y, тканевой калликреин, лейциновую аминопептидазу (общую), лейциновую аминопептидазу (цитозольную), лейциновую аминопептидазу (микросомальную), матриксную металлопротеазу, метиониновую аминопептидазу, нейтразу, папаин, пепсин, плазмин, прогидразу, 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 C-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-сингтетазы 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-сингтетазы является обычной задачей, включая, например, одноклеточные полиморфные формы, перечисленные в табл. А, для создания полипептида AARS, содержащего одно или более аминокислотные изменений, на основе последовательности любого из гомологов, ортологов и природных изоформ человека, также как и других видов гистидил-тРНК-сингтетазы.

Таблица А

Одноклеточные полиморфные формы (SNP) человеческих гистидил-тРНК-сингтетаз

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. "Выпетленные" 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 связывании 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 1,5×, 2×, 2,5×, 3×, 3,5×, 4×, 4,5×, 5×, 6×, 7×, 8×, 9×, 10×, 15×, 20×, 25×, 30×, 40×, 50×, 60×, 70×, 80×, 90×, 100×, 200×, 300×, 400×, 500×, 600×, 700×, 800×, 900×, 1000× 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 1,5×, 2×, 2,5×, 3×, 3,5×, 4×, 4,5×, 5×, 6×, 7×, 8×, 9×, 10×, 15×, 20×, 25×, 30×, 40×, 50×, 60×, 70×, 80×, 90×, 100×, 200×, 300×, 400×, 500×, 600×, 700×, 800×, 900×, 1000× 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 Youvan (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 Н при физиологических значениях рН, 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 рН. Аминокислоты, содержащие кислые боковые цепи, включают глутаминовую кислоту и аспарагиновую кислоту.

Основные: остаток имеет положительный заряд из-за ассоциации с ионом Н при физиологических значениях рН или в пределах одной или двух единиц от физиологического значения рН (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 рН. Аминокислоты, имеющие основную боковую цепь, включают аргинин, лизин и гистидин.

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

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

Нейтральные/полярные: остатки не заряжены при физиологических значениях рН, 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. Кодируемая 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	тироzin, 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 (a) 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 вариантом 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 устраниния 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 устраниению 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, делекции, 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, гидроксилирование, метилирование, амидирование и присоединение углеводных или липидных фрагментов, кофакторов и т.п. Типичные модификации также включают пэгилирование полипептида AARS (см., например, Veronese and Harris, Advanced Drug Delivery Reviews 54: 453-456, 2002; и Pasut et al., Expert Opin. 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 ограничиваются ими; поливинилспирт, другие поли(алкиленоксиды), такие как поли(пропиленгликоль) и т.п., поли(оксиэтилованные полиолы), такие как поли(оксиэтилованный глицерин) и т.п., карбоксиметилцеллулоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, этилен/малеиновый ангидрид и полiamинокислоты. 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-гидроксисукциниамида и карбоновые кислоты, для сочетания с помощью различных способов с N-концевой, C-концевой или любой внутренней аминокислотой полипептида AARS. Улучшенная технология пэгилирования 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 мембранны 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 гидроксиэтилкрахмала (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 гибридизованных 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 мембранны, 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 транслокироваться 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, транспортирующиеся 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 секреции естественным образом сигнальные последовательности, которые являются производными других хорошо описанных секреируемых 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 раздельно 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 аминоацил-tРНК-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-tРНК-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, антисмыловые 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 одноцепочные и двуцепочные 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, 41, 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, 41, 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 NaHPO₄ (рН 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 NaHPO₄ (рН 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 NaHPO₄ (рН 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 NaHPO₄ (рН 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 NaHPO₄ (рН 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 NaHPO₄ (рН 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 отмычки, 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 (log₁₀ M) + 0,41 (%G+C) - 0,63 (% формамид) - (600/длина), где M 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 мембранны (например, нитроцеллюлозную мембранию или нейлоновую мембранию), содержащую иммобилизованную ДНК, гибридизовали в течение ночи при 42°C в буфере для гибридизации (50% деионизированный формамид, 5×SSC, 5×Раствор Денхардта (0,1% фиколл, 0,1% поливинилпирролидон и 0,1% бычий сывороточный альбумин), 0,1% ДСН и 200 мг/мл дентатированной ДНК из молок лососевых), содержащую меченный зонд. Затем мембранию 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 (Mantyh et al. PNAS 92: 2662-2666 (1995); Mantyh et al., Prot. Expr. & Purif. 6, 124 (1995)).

Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, независимо от длины самой кодирующей последовательности, можно комбинировать с другими последовательностями ДНК, такими как промоторы, сигналы полиденилирования, 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 нукleinовых кислот в конкретные клетки, клетки-мишени млекопитающего, в частности, человека, страдающего нарушением или состоянием, для лечения которого требуется указанная терапия. Нукleinовая кислота вводится в выбранные клетки-мишени таким образом, что экспрессируется гетерологичная ДНК, и таким образом, продуцируется закодированный терапевтический продукт.

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

стоящем изобретении, включают аденоовирус, 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 мышного лейкоза Молони (MoMuLV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус мышной 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 геном 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 внутриLTR. 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 аденоовирус-лиганд-ДНК, непосредственную инъекцию ДНК, преципитацию СаСО₄, 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 амфи菲尔ных молекул, таких как фосфатидилсерин или фосфатидилхолин, инкапсулирует часть окружающей среды, например, липидный бислой окружает гидрофильную внутреннюю часть. Могут быть сконструированы униламеллярные и мультиламеллярные 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 хозяйствских 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 производятся 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 нукleinовых кислот, указанный олигонуклеотид может обеспечивать промотор, если он содержит последовательность, распознаваемую 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 комплементарным 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, 2.sup.nd 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, Масачусетс).

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. Одни 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, хемилуминесцентные 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 авторадиографии. Радиоактивно меченные рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды и аминокислоты являются коммерчески доступными. Доступны нуклеотиды, которые являются радиоактивно меченными по первой, или α , фосфатной группе или третьей, или γ , фосфатной группе. Например, [α - ^{32}P] dATP и [γ - ^{32}P] 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, тетраметицлодамин, 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, Карлсbad, 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 avidinом 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 (Карлсbad, 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, Фаэтвилл, Арканзас; Ocean Nanotech, Фаэтвилл, 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 сортировкой в соответствии с желаемым размером и/или длиной волны испускания. Два примера ссылок, в которых квантовые точки помещали в epitаксиальные 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 меченными 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 аминогруппу в альфа- или бета-положении (такой как нафтиламиновый краситель, 1-диметиламинонафтил-5-сульфонат, 1-анилино-8-нафтилсульфонат и 2-п-толуидинил-6-нафтилсульфонат); краситель, который содержит 3-фенил-7-изоцианатокумарин; акридин, такой как 9-изотиоцианатоакридин и акридин оранжевый; пирен, бензоксадиазол и стилбен; краситель, который содержит 3-(ε-карбоксипентил)-3'-этил-5,5'-диметилоксакарбоксилат (CYA); 6-карбоксифлуоресцеин (FAM); 5,6-карбоксиродамин-110 (R110); 6-карбоксиродамин-6G (R6G); N,N,N',N'-тетраметил-6-карбоксиродамин (TAMRA); 6-карбокси-

X-родамин (ROX); 6-карбокси-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцеин (JOE); ALEXA FLUOR™; Cy2; Texas Red и родамин красный; 6-карбокси-2',4,7,7'-тетрахлорфлуоресцеин (TET); 6-карбокси-2',4,4',5',7,7'-гексахлорфлуоресцеин (HEX); 5-карбокси-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 клеточной 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. 2В, 5В или 8В, или, в альтернативном варианте с любой аминокислотной последовательностью С-конца указанного сайта сплайсинга, например, такой как перечисленные в табл. 2В, 5В или 8В. 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 epitопов, которые не обнаруживаются в соответствующей или исходной AARS. Примеры также включают антитела, которые специфично связываются с N- или С-концом, образованном 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 анагонизма 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 1,5×, 2×, 2,5×, 3×, 3,5×, 4×, 4,5×, 5×, 6×, 7×, 8×, 9×, 10×, 15×, 20×, 25×, 30×, 40×, 50×, 60×, 70×, 80×, 90×, 100×, 200×, 300×, 400×, 500×, 600×, 700×, 800×, 900×, 1000× 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 вариабельных ("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 Мильстейном (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 вариабельных участков тяжелой цепи и семи вариабельных участков легкой цепи. Комбинация указанных генов дает начало 49 каркасам в основной библиотеке. Путем перекрывания высоко вариабельных 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.

Одноцепочный 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; Verhoeven 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 нМ. 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 1,5×, 2×, 2,5×, 3×, 3,5×, 4×, 4,5×, 5×, 6×, 7×, 8×, 9×, 10×, 15×, 20×, 25×, 30×, 40×, 50×, 60×, 70×, 80×, 90×, 100×, 200×, 300×, 400×, 500×, 600×, 700×, 800×, 900×, 1000× 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 мКМ.

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 индустрии 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, стерины, 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 Даутон (Да), как правило, между примерно 300 и 700 Да, и включая примерно 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 500, 650, 600, 750, 700, 850, 800, 950, 1000 или 2000 Да. Библиотеки малых молекул описаны в другой части настоящего изобретения.

В качестве связывающих агентов также предложены антагомеры (см., например, Ellington et al., Nature. 346, 818-22, 1990; и Tuerk et al., Science. 249, 505-10, 1990). Примеры включенных антагомеров представляют собой антагомеры нуклеиновых кислот (например, ДНК-антагомеры, РНК-антагомеры) и пептидные антагомеры. Антагомеры 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 мишениями, такими как низкомолекулярные соединения, белки, нуклеиновые кислоты и даже клетки, ткани и организмы. См., например, патенты США № 6376190 и 6387620. Таким образом, включены антагомеры нуклеиновых кислот, которые связываются с полипептидами AARS, описанными в настоящем изобретении, и/или их партнерами по связыванию.

Пептидные антагомеры, как правило, включают вариабельную пептидную петлю, присоединенную с обоих концов к белковому каркасу, двойное закрепление структуры, которое, как правило, повышает аффинность связывания пептидного антагомера до уровня, сравнимого с уровнем для антитела (например, в наномолярном диапазоне). Согласно конкретным вариантам реализации изобретения длина вариабельной 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 вариабельная 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 антагомеров описаны, например, в заявке на патент США № 2003/0108532. Таким образом, включены пептидные антагомеры, которые связываются с полипептидами AARS, описанными в настоящем изобретении и/или их партнерами по связыванию. Выбор пептидного антагомера может осуществляться с использованием различных систем, известных в данной области техники, включая дрожжевую двугибридную систему.

Также включены АДНЕКТИНЫ™, АВИМЕРЫ™, аналоны и антикалины, 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 даргин 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 "монотела", 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 уложенном виде 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.

Антикалины 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. Антикалины, как правило, имеют размер примерно 20 кДа. Антикалины 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 для сравнения между различными партиями агентов. Сравнения партий могут быть основаны 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 антисмыловые 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 доза, 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 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 поддающегося измерению эффекта, и пороговая доза относится к первой точке на графике, показывающей ответ выше нуля. Как правило, для более сильных лекарственных средств получаются 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, мышью 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 конститutive 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 PSPORT1 (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 амино-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 XA, таким образом, что клонированный интересующий полипептид может самопроизвольно высвобождаться 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 лизазно-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 хозяйственном штамме BL21(DE3), содержащем лизоген λ DE3 BL21, который поддерживает T7-опосредованную экспрессию и не имеет протеаз lon иompT, для улучшения стабильности белка-мишени. Также включена экспрессия хозяйственных штаммов, содержащих плазмиды, кодирующие tРНК, которые редко используются в *E.coli*, такие как штаммы ROTSETTA™ (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 гексагистидиновые 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 из 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, алкогольксидаза 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 pastoris* (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 ферментаерах на 15L, 50L, 100L и 200L и т.д.

В случаях, когда используются растительные векторы экспрессии, экспрессия последовательности, кодирующую 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 омегалидерной последовательностью из вируса табачной мозаики TMV (Takamatsu, EMBO J. 6:307-311 (1987)). В альтернативном варианте можно применять растительные промоторы, такие как малая субединица 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 полиэдрона, и помещать под контроль промотора полиэдрона. Успешное встраивание кодирующей полипептид последовательности приводит к инактивации гена полиэдрона 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. pi (см., например, Murphy and Piwnica-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 адено-вирус в качестве вектора экспрессии, последовательности, кодирующие интересующий полипептид, можно лигировать в комплекс транскрипции/трансляции адено-вируса, 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 Райса (RSV), для повышения экспрессии в хозяйской клетке млекопитающего.

Примеры применимых хозяйственных 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 хозяйственные 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 хозяйственных 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 фланонах или клеточных фабриках, или суспензионные культуры, выращенные, например, во вращающихся фланонах 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 инициирующие сигналы также можно применять для достижения более эффективной трансляции последовательностей, кодирующих интересующий полипептид. Указанные сигналы включают инициирующий кодон ATG и прилежащие последовательности. В случаях, когда последовательности, кодирующие полипептид, его инициирующий 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 инициирующий кодон ATG. Более того, инициирующий кодон должен находиться в правильной рамке считывания для обеспечения трансляции целой встроенной последовательности. Экзогенные элементы трансляции и инициирующие 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 хозяйственных 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, СНО, 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 высокоеффективной 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 oriDжины 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 клонды 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 СНО.

Любое число систем селекции может использоваться для восстановления трансформированных или трансдуплицированных клеточных линий. Указанные включают, но не ограничиваются перечисленными: гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al., Cell 11:223-232 (1977)) и аденинфосфорибо-зинтрансферазы (Lowy et al., Cell 22:817-823 (1990)), которые можно применять в tk- или aprt-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)); prt, который обеспечивает устойчивость к аминогликозидам, неомицину и G-418 (Colbere-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1-14 (1981)); и als или rat, которые обеспечивают устойчивость к хлорсульфуруону и фосфинотриациетилтрансферазе, соответственно (Murty, выше). Были описанные другие селективные гены, например, trpB, которые позволяют клеткам использовать индол вместо триптофана, или his, который позволяет клеткам использовать гистидинол 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 высокоеффективные 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 высокоеффективные 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 моно-клональные антитела, специфические для указанного продукта, известны в данной области техники. Примеры включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), вестерн-иммуноблотинг, 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 меченной 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 разстить в бессывороточной среде (см., например, Rosser et al., Protein Expr. Purif. 40:237-43, 2005; и патент США № 6210922).

Белок, продуцированный 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, кодирующими 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 монодисперсным, 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. Лиофилизацию часто осуществляют после проведения ЖХВД, и с ее помощью можно удалять большую часть или все летучие компоненты из смеси. Также предусмотрены методы ультрафильтрации, которые, как правило, используют одну или более селективную проникаемую 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 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 вместиться 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 дальше 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, Аничетти (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, анти-смысловые, 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, высокоеффективные 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).

Расторимость 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/нерасторимость, 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-кореляционной 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 изобретени, 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 различия 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 терапевтическая 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 характеристизацию 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 различия их от других клеток, тканей или субъектов. Неограничивающие примеры включают способы выявления присутствия или уровня полипептида или полинуклеотида AARS в биологическом образце для различия 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 иммортилизованные 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, "本身就应该是 positive determination"). 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., All 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 \times , 1,3 \times , 1,4 \times , 1,5 \times , 1,6 \times , 1,7 \times , 1,8 \times , 1,9 \times , 2,0 \times , 2,2 \times , 2,4 \times , 2,6 \times , 2,8 \times , 3,0 \times , 4,0 \times , 5,0 \times , 6,0 \times , 7,0 \times , 8,0 \times , 9,0 \times , 10,0 \times , 15,0 \times , 20,0 \times , 50,0 \times , 100,0 \times , 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 и десятичные дроби между ними (например, 1,24 \times , 1,25 \times , 2,1 \times , 2,5 \times , 60,0 \times , 75,0 \times 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 $0,05 \times$, $0,1 \times$, $0,2 \times$, $0,3 \times$, $0,4 \times$, $0,5 \times$, $0,6 \times$, $0,7 \times$, $0,8 \times$, $0,9 \times$, $1,0 \times$, $1,1 \times$, $1,2 \times$, $1,3 \times$ или $1,4 \times$ 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, $0,15 \times$, $0,25 \times$, $0,35 \times$ 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 различия 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 различия 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 мартышки, 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, фалlopиевых 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 междуtotипotentной клеткой, плuriпотентной клеткой, мультипотентной прогениторной стволовой клеткой и зрелой, полностью дифференцированной клеткой.

Тотипotentная 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 totипotentность. Плuriпотентная клетка включает стволовую клетку, которая имеет способность дифференцироваться в любой из трех зародышевых листков, включая эндодерму (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: гематопоэтические 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 нукleinовой 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 гибридизационные 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 гибридизационного 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 нукleinовых кислот для детектирования полинуклеотидных последовательностей AARS. Термин

"амплификация" или "амплификация нуклеиновых кислот" относится к продукции множества копий нукleinовой кислоты-мишени, которая содержит по меньшей мере часть предполагаемой специфической последовательности-мишени нукleinовой 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 инициируют 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 нукleinовой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, где выявляемая амплификация последовательности-мишени по существу ограничена амплификацией последовательности-мишени, в которую вносит вклад интересующий образец нукleinовой кислоты, подверженный тестированию, и не вносит вклад последовательность нукleinовой 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 нукleinовых 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 мишениями 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 нукleinовых 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 нукleinовых кислот требуют термоциклирования для чередования циклов денатурации двуцепочечной нукleinовой кислоты и гибридизации праймеров; однако, другие хорошо известные способы амплификации нукleinовых 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 нукleinовой 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 ("C_t") в каждой реакции.

Термин "значение C_t" 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 C_t указывает на высокий уровень экспрессии гена в образце, и высокое

значение Ct 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 dNTPoS для продукции дуплекса гемифосфориотированного 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 Qβ-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 ТМА. 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 ТМА, которая использует РНК-полимеразу для продукции множества РНК-транскриптов участка-мишени (патент США № 5480784 и 5399491). ТМА 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 ТМА в присутствии второго праймера, способного гибридизоваться с РНК-транскриптами. В отличие от ПЦР, ЛЦР или других способов, которые требуют термической денатурации, ТМА представляет собой изотермический способ, использующий активность РНКазы Н 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 Н вместе с обратной транскриптазой, обеспечивающей амплификацию.

В иллюстративном способе ТМА, 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 "T7-праймер", когда он является специфичным для распознавания РНК-полимеразы T7. 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 Н деградирует РНК-мишень. Второй праймер для амплификации затем связывается с кДНК. Указанный праймер может называться "не-T7 праймер" для отличия его от "T7-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 РНКазы Н 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 GENECHIP™. 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, полученным 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 иммунофлуоресцентные 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 Ouellette 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. Антисмыловые и РНКи-агенты.

Варианты реализации настоящего изобретения также включают антисмыловые олигонуклеотиды и РНКи-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 антисмыловых или РНКи 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 антисмыловые или РНКи 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 антисмыловых или РНКи-агентов способ, в частности, модулирует его неканоническую активность. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения антисмыловые или РНКи-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.

A. Антисмыловые агенты.

Термины "антисмыловой олигомер" или "антисмыловое соединение" или "антисмыловой 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 нукleinовой кислоте (как правило, РНК) путем спаривания оснований Уотсона-Крика, с образованием гетеродуплекса нукleinовая 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.

Антисмыловые 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 антисмыловой направленной последовательностью является достаточной для образования стабильного дуплекса. Участок комплементарности антисмыловых 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. Атисмыловой 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 антисмыловые 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 оптимальен 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 антисмыловые олигомеры (например, ПНК, LNA, 2'-OMe, 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 антисмыловые 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 нукleinовой 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 антисмыловый олигомер не обязательно является на 100% комплементарным последовательности-мишени нукleinовой кислоты AARS, он является эффективным для того, чтобы стабильно и специфично связываться с последовательностью-мишенью, приводя, таким образом, к модулированию биологической активности нукleinовой 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 антисмылового 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 антисмыловые олигомеры могут иметь T_m связывание 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 антисмылового 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 антисмыловые олигомеры для блокировки или подавления трансляции мРНК или для подавления сплайс-процессинга природной пре-мРНК или индукции деградации мРНК-мишени 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 некодирующую последовательность мРНК транскрипта AARS и может, таким образом, находиться внутри экзона или внутри интрана. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения последовательность-мишень является относительно уникальной или исключительной среди последовательностей AARS (например, полноразмерной AARS) и являться 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 нукleinовой 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 "A-G-T" является комплементарной последовательности "T-C-A". Комплементарность может быть "частичной", когда только некоторые из оснований нукleinовой кислоты не соответствуют согласно правилам спаривания оснований. Или же указанные последовательности нукleinовых кислот могут иметь "идеальную" или "полную" комплементарность (100%). Степень комплементарности между цепями нукleinовой кислоты оказывает значительное влияние на эффективность и силу гибридизации между цепями нукleinовой 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 "антисмыловая 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 антисмылового 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 областями-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 намеченным (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°C, или больше. Указанная гибридизация предпочтительно соответствует строгим условиям гибридизации. При конкретной ионной силе и рН, 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 антисмылового 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-мишениями 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 РНКазН, которая способна разрезать дуплексные 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 аминоалкилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, сложные тионоалкилфосфотриэфиры и бораноfosфаты, имеющие нормальные 3'-5' связи, 2'-5'-связанные их аналоги и группы, которые имеют противоположную ориентацию, где смежные пары нуклеозидных 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'-OMe), 2'-метоксиэтоксиолигонуклеотиды (MOE), 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-триметилэтоксибензол, 3-метилурацил, дигидроуридин, нафтил, аминофенил, 5-алкилщитиды (например, 5-метилщитидин), 5-алкилуридины (например, риботимидин), 5-галоуридин (например, 5-бромууридин) или 6-азапиридины или 6-алкилпиридины (например 6-метилуридин), пропин, квеозин, 2-тиоуридин, 4-тиоуридин, вибутозин, вибутоксозин, 4-ацетилтидин, 5-(карбоксигидроксиметил)уридин, 5'-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилуридин, β-D-галактозилквеозин, 1-метиладенозин, 1-метилинозин, 2,2-диметилгуанозин, 3-метилщитидин, 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-оксикусусную 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 антисмыловых химических соединений, таких как 2'-О-метильные антисмыловые олигонуклеотиды, которые являются более подобными РНК, T 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 походящими для применения в качестве антисмыловых 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 полиямидный скелет замещает традиционное фосфатно-рибозное кольцо ДНК. Несмотря на радикальные структурные изменения природной структуры, ПНК способна к последовательность-специальному 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 кэпирования. Патенты компании Panagene, 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 фосфодиэфирные 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 фосфородиамидоморфолиновый 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 амино или амино, 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 мочевинной 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 Т_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 РНКазами 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.

B. 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 аминоацил-тРНК-синтетазы (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 "двуцепочечный" обозначает две отдельные цепочки нукleinовых 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 двуцепочечной молекулы, где две отдельные цепочки являются по существу комплементарными и, таким образом, гибридизуются друг с другом. "дцРНК" относится к молекуле рибонукleinовой кислоты, имеющей дуплексную структуру, содержащей две комплементарные и антипараллельные цепочки нукleinовых 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 двуцепочечности 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 двуцепочечной 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 ("комplementарная" или "антисмыловая" 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 нуклеозидных остатка по сравнению со второй цепочкой. Согласно другим вариантам реализации изобретения первая цепочка и вторая цепочка имеют одинаковое количество нуклеозидов; однако, первая и вторая цепочки могут быть смещены таким образом, что два концевых нуклеозида на первой и второй цепочке не являются спаренными с остатком на комплементарной цепочке. В конкретных примерах два нуклеозида, которые не являются спаренными, представляют собой остатки тимицина.

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 самогибридизующихся структур предшественника РНК, состоящих из ~70 нуклеотидов и известных как пре-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 нуклеозидов.

Одноцепочечные участки миРНК-агента могут быть модифицированы или включать имитаторы нуклеозидов, 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 миРНК-агента, например, против действия экзонуклеаз или для облегчения входа антисмыслового миРНК-агента в RISC. Модификации могут включать C3 (или C6, C7, C12) аминолинкеры, тиоловые линкеры, карбоксильные линкеры, не нуклеотидные спейсеры (C3, C6, C9, C12, без основания, триэтиленгликолевые, гексаэтиленгликолевые), специальные биотиновые или флуоресцеиновые реагенты, которые становятся фосфорамидитами и которые содержат другую DMT-защищенную гидроксильную группу, позволяя множественные сочетания во время синтеза РНК.

миРНК 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-индукционный 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 миРНК-агенты или продукты их расщепления, могут подавлять ген-мишень, например, путем индуцирования РНКи в отношении РНК-мишени, предпочтительно AARS-мишени, такой как выбранный сплайс-вариант.

Каждая цепочка миРНК-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 миРНК-агенты имеют дуплексный участок, состоящий из 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24 или 25 пар нуклеотидов и один или более "липких концов", предпочтительно один или два 3'-'липкий конца", состоящих из 2-3 нуклеотидов.

Помимо гомологии РНК-мишени и способности подавлять ген-мишень, миРНК-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, миРНК-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 C2' рибозы. Указанное пространственное предпочтение фтора, в свою очередь, может заставлять сахар образовывать C3'-концевой излом плоскости углеводного кольца. Это такой же тип излома, который наблюдается в молекулах РНК и дает начало характерному для РНК типу спирали семейства A. 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 H-связывании, которое является более характерным для OH-фрагмента рибонуклеотида, чем для H-фрагмента дезоксирибонуклеотида.

"Одноцепочный РНКи-агент" в настоящем изобретении, представляет собой РНКи-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". Одноцепочные РНКи модулирующие агенты предпочтительно являются антисмысловыми по отношению к молекуле-мишени. Одноцепочный РНКи-агент должен быть достаточно длинным для того, чтобы он мог входить в RISC и принимать участие в RISC-опосредованном расщеплении мРНК-мишени. Длина одноцепочечного РНКи 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 РНКи-агенты, содержащие шпильки, могут иметь дуплексный участок, который равен или по меньшей мере составляет 17, 18, 19, 29, 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 одноцепочный "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 РНКи-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 нукleinовой 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, РНКи-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, нитроимидазолил, нитроиндолил, нафталенил, антраценил, пиридинил, хинолинил, 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 нитроимидазолил. 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 ароматические соединение. В конкретных примерах лиганд представляет собой холесерил.

Согласно другим вариантам реализации изобретения РНКи-агент представляет собой олигонуклеотид, связанный с лигандом в целях улучшения клеточной направленности и захвата. Например, РНКи-агент может быть связан с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В качестве дополнительного примера, РНКи-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 РНКи-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 антисмыловые 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 антисмыловые олигонуклеотиды для применения в способах, предложенных в настоящем изобретении, могут быть модифицированы с помощью группы, не являющейся лигандом. Ряд молекул, не являющихся лигандами, конъюгирували 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), тиоэфир, 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-O-гексадецил-гас-глицеро-3-N-фосфонат (Manoharan et al., TeTraphedron Lett., 1995, 36:3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777), цепь полиамина или полиэтилгликоля (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969) или уксусная кислота адамантана (Manoharan et al., TeTraphedron Lett., 1995, 36:3651), пальмитоловый фрагмент (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229) или октадециламиновый или гексиламинокарбонилоксихолестриновый 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 аминолинкер 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, аденоизвестных 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 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) сплайсвариантов 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 образом 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, небиологическое) 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 их 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., р. 34-49, 1983. Полученная аминокислотная последовательность может использоваться в качестве направляющей для генерации смесей олигонуклеотидов, которые можно применять для скрининга на предмет последовательности гена, кодирующую 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 плазмида, которые кодируют два гибридных белка: одна плазмида 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.

Двухгибридная 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. Кодируемый 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 агара 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, Boxem 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 по основанию 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 с) 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 закреплены 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 меченным, 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 меченными 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 моно克лональные 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 отмычки) 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 меченым, 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 меченым 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-МС (МС с ионизацией лазерной десорбцией с использованием матрицы), ИЭР-МС, МС с бомбардировкой ускоренными атомами и т.п., используется вместе с масс-спектрометром (например, масс-спектрометром двойного фокусирования, квадрупольным масс-спектрометром, времязапорным 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 мембранный 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 СНО, клетки НЕК293, 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 антисмыловой 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 антисмыловые 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, Мэриленд, и т.д.).

ХII. 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, антисмыловые олигонуклеотиды, РНКи-агенты, а также связывающие агенты, такие как пептиды, анти-тела 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, гематопоэза, 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 антисмыловых 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 антисмыловых 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, антилел 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 бляшек 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 гематопоэза и связанных состояний. Примеры гематопоэтических 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 гематопоэтические процессы включают эритропоэз, гранулоцитопоэз, лимфопоэз, мегакариоцитопоэз, тромбоцитопоэз и т.д. Также включены способы модуляции траффика или мобилизации гематопоэтических клеток, включая гематопоэтические стволовые клетки, клетки-предшественники, эритроциты, гранулоциты, лимфоциты, мегакариоциты и тромбоциты.

Способы модуляции гематопоэза 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 гематопоэтические стволовые клетки, гематопоэтические клетки-предшественники или другие стволовые клетки или клетки-предшественники, которые способны дифференцироваться в гематопоэтическом направлении (например, произошедшие из живой ткани стволовые клетки). Для осуществления способов *in vitro* и *ex vivo* стволовые клетки и клетки-предшественники, гематопоэтического 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, производство 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 мембранный 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 адьюванта в вакцине или связанной композиции, или присутствуя в композиции вместе с отдельным адьювантом 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, интрапекальным, интрапаренхимальным, интрацистернальным, внутрижелудочковым, интруауретральным, 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 инъекций, 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, пищегенности, 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 аминогруппами 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, прокайн 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 суспензирования 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 ламellarные везикулы или микрочастицы на основе поли(DL-молочной-ко-гликолевой)кислоты (PGLA), поли(DL-лактид-ко-гликолида) (PLG) или поли(лактида) (PLA) с нагрузкой лекарственного средства, гидрогели (Hoffman AS: All. N.Y. Acad. Sci. 944: 62-73 (2001)), системы полиаминокислотных наночастиц, которые продаются под торговой маркой MEDUSA®, разработанной компанией Flamet Technologies Inc., неводные гелевые системы, которые продаются под торговой маркой ATRIGEL®, разработанной компанией Atrix, Inc., и лекарственные формы на основе изобутириата ацетата сахарозы пролонгированного действия, которые продаются под торговой маркой SABER®, разработанной компанией Direct 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, варьирующегося 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, нанокапсул, 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 биодеградируемые субстраты, такие как полимеры и матрицы. Примеры указанных твердых субстратов включают, но не ограничиваются перечисленными: полизэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(винилспирт), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ-этил-L-глутамата, не деградируемый этиленвнилацетат, деградируемые сополимеры молочной кислоты и гликоловой кислоты, такие как поли(молочная-ко-гликоловая кислота) (PLGA) и LUPRON DEPOT™ (микросфера для инъекций, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликоловой кислоты и лейпролида ацетата), поли-D-(−)-3-гидроксимасляную кислоту, коллаген, металл, гидроксиапатит, биостекло, алюминат, биокерамические материалы и очищенные белки.

Согласно одному конкретному варианту реализации изобретения твердый субстрат содержит биодеградируемые полимеры, продающиеся под торговой маркой ATRIGEL™ (QLT, Inc., Ванкувер, Канада). Система доставки лекарственных средств ATRIGEL® состоит из биодеградируемых 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 имплантате. Лекарственное средство, инкапсулированное в имплант, затем высвобождается контролируемым образом по мере того, как полимерная матрица со временем биодеградирует.

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, имплантаты, губки, волокна, повязки и микрорезумльсии. 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, фенофореза, 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 квалифицированным практикам 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 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 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 подвергаемого 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: антineопластические 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 определят 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, (AGGAGGTAAACATATGCATCATCATCACGGTAAAGCCTATCCSTAACCCTTGCTCGGTCTCGATTCTACG) (SEQ ID NO: 1), который слит в рамке с предсказанной открытой рамкой считывания полипептида AARS. В случаях, когда полипептид AARS содержит предсказанный нативный инициирующий 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 GAAGGAGATATAACAT (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*, (GGTAAGCCTATCCSTAACCCCTCGGTCTCGATTCTACGCACCACCATC CACCATTAATGACTCGAG) (SEQ ID NO: 7), который слит в рамке с предсказанный 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 предсказанный открытой рамки считывания встраивали сайт рестрикции *BamHI*. В случаях, когда полипептид AARS содержал предсказанный нативный инициирующий остаток метионина (ATG) или первый аминокислотный остаток предсказанный полипептида AARS представлял собой Met, указанный остаток удаляли. Кроме того, на 3' конце предсказанный 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, (CATATGCATCATCATCATCACGGTAAGCCTATCCSTAACCCCTCTCGTGTCTCGATTCTACGGGATCC) (SEQ ID NO: 8), в рамке с инициирующим кодоном (ATG), встроенным в сайт рестрикции *NdeI*. Указанное 5'-удлинение слито с открытой рамкой считывания предсказанный полипептида AARS с помощью короткого линкера, состоящего из 2 аминокислот, (GS).

На 3'-конце предсказанный 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 рекомбинационного расщепления и клонирования ДНК, кодирующую C-меченный полипептид AARS, клонировали в C-меченном векторе (pET24b C-V5/6xHis), содержащем 5' последовательность, кодирующую инициирующий кодон (ATG), встроенный в сайт рестрикции *NdeI*, который слит с открытой рамкой считывания предсказанный полипептида AARS с помощью короткого линкера, состоящего из 2 аминокислот, (GS), (CATATGGGATCC) (SEQ ID NO: 10).

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

CTCGAGGGTAAGCCTATCCSTAACCCCTCCCTCGGTCTCGATTCTACGCACCACCA ACCACCACCAATAATGA (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 большего 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 мМ 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 Bugbuster, 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 ресуспенсировали путем многократного пипетирования до тех пор, пока не оставалось видимых агрегатов, и переносили в пробирки Эппendorфа, 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 ресуспенсировали 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 супензии Ni-NTA Superflow, включенной в набор Ni-NTA Superflow 96 BioRobot и ионообменную смолу уравновешивали путем добавления 600 мкл связывающего буфера (20 мМ фосфат натрия, 500 мМ хлорид натрия и 10 мМ 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 мМ фосфат натрия, 500 мМ хлорид натрия и 500 мМ 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 супензии Ni-NTA Superflow (Qiagen, кат. № 30450) и 0,5 мл ионообменной смолы уравновешивали 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 мембранный 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 мембранный Ultrace1-3 или Ultrace1-10 (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 лизоназы (EMD chemicals, кат. по 71370) и полную смесь ингибиторов протеаз без ЭДТА "complete mini EDTA-free" (Roche, кат. № 11836170001)). Осадки ресуспенсировали путем многократного пипетирования до тех пор, пока не оставалось видимых агрегатов, и переносили в пробирки Эппendorфа, 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 ресуспенсировали 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 ресуспенсировали 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 ресуспенсировали в денатурирующем связывающем буфере. Для объема 1 л, использовали микрофлюидизацию при 14000 фунтов/кв. дюйм (Microfluidics, кат. № 110L) вместо использования лизирующего буфера. После ресуспенсирования 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 уравновешивали 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 мМ фосфат натрия, 500 мМ хлорид натрия, 6 М гидрохлорид гуанидина и 500 мМ 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 уравновешивали 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, мембранию Omega 10K 96-луночных фильтрационных планшетов AcroPter (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 мМ Tris, 250 мМ хлорид натрия, 10 мМ хлорид калия, 2 мМ хлорид магния, 2 мМ хлорид кальция, 400 мМ сахарозы, 500 мМ аргинина, 1 мМ 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 мембранный 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 мембранный 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 мМ ацетат натрия, 10 мМ хлорид натрия, 0,4 мМ хлорид калия, 1 мМ ЭДТА, 400 мМ сахароза, 500 мМ аргинин, 1 мМ DTT и 0,01% полисорбат 80, pH 6,0. Для полипептидов AARS с pI<7, образцы разбавляли в 20 раз в следующем буфере: 50 мМ Tris, 250 мМ хлорид натрия, 10 мМ хлорид калия, 2 мМ хлорид магния, 2 мМ хлорид кальция, 400 мМ сахарозы, 500 мМ аргинин, 1 мМ 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 мембранию Omega 10K 96-луночного фильтрационного планшета AcroPter 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 мембранный 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 AcroPter Advance с мембранный 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, полидисперность, предсказанную среднюю молекулярную массу, процентную интенсивность и процентную массу.

Эксклюзационная 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 эксклюзационной хроматографии Superdex 200 10/300 GL (General Electric, кат. № 17-5175-01). Колонку сначала уравновешивали с помощью 1,5 объемов колонки (CV) 1X буфера ФСБ, с последующим вводом образца. Колонку промывали 1 CV 1× 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 микрощентрифужную 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, 300Å, Michrom, кат. № PM5/64300/00) с использованием баллона высокого давления. ЖХ/МС-анализ проводили на масс-спектрометре типа ионной ловушки ТерМоФишер 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 мишней, 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 плuriпотентных 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 нейрональном 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 гематопоэтических 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 эндодермального 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 гематопоэза, 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 микрографитации 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 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-к-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 .

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 прерамплификации. 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 (ABC1), 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-IIIB 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	B-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_0010817 55	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_0011996 49	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

030418

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 HXK2
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	HPRT 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_0011112 85	инсулин-подобный фактор роста 1 (соматомедин C)	IGF-I IGF1A IGFI
IGF2	NM_0011275 98	инсулин-подобный фактор роста 2 (соматомедин A)	C11orf43 FLJ22066 FLJ44734 INSIGF1pp9974
IGFBP3	NM_0010133 98	связывающий инсулин-подобный фактор роста белок 3	BP-53 IBP3
IGFBP5	NM_000599	связывающий инсулин-подобный фактор роста белок 5	IBP5
IKBKB	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

030418

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	HDLQ11 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 SPM
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, индуцибелльная	HEP-NOS INOS NOS NOS2A
NOTCH1	NM_017617	notch 1	TAN1 hN1

NR3C1	NM_0010240 94	ядерный рецептор подсемейства 3, группа С, 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 обезьяны (<i>v-sis</i>))	FLJ12858 PDGF2 SIS SSV c-sis
PDK4	NM_002612	киназа пируватдегидрогеназы, изоизим 4	FLJ40832
PLA2G1B	NM_000928	фосфолипаза А2, группа IB (поджелудочная железа)	MGC119834 MGC119835 PLA2 PLA2A PPLA2
PLIN1	NM_002666	белок, ассоциированный с липидными каплями	перилипин
PPARG	NM_138712	активируемый пролифератором пероксидом рецептор гамма	CIMT1 GLM1 NR1C3 PPARG1 PPARG2 PPARgamma
QARS	NM_005051	глутамил-тРНК-синтетаза	GLNRS PRO2195
RHOA	NM_001664	семейство генов гомологии <i>ras</i> , член A	ARH12 ARHA RHO12 RHOH12
RUNX1	NM_001754	runt-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_0011654 13	ингибитор серпиновой пептидазы, ветвь Е (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	тромbosпондин 4	TSP4
TNF	NM_000594	фактор некроза опухоли	DIF TNF-alfa TNFA TNFSF2
TUBB	NM_178014	тубулин, бета	M40 MGC117247 MGC16435 OK/SW-cl,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 А	MGC70609 MVC1 VEGF VPF
VIM	NM_003380	виментин	FLJ36605
WISP1	NM_080838	белок WNT1-индуцирующего 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 Ct для всех интересующих генов сначала нормировали по отношению к средним значениям Ct для "генов домашнего хозяйства" из соответствующего образца для получения значений ΔCt ($\Delta C_t = C_t$ для гена - Ct для среднего гена "домашнего хозяйства"). Гены из каждого образца затем нормировали к такому же гену в необработанном контроле для получения значений ΔΔCt ($\Delta \Delta C_t = \Delta C_t$ 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. $\Delta \Delta C_t$ менее 0): кратность изменения = $-(2^{\Delta \Delta C_t})$.

Анализы 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.

Hoechst 33432. Стандартные методы подсчета клеток для оценки пролиферации осуществляли с использованием красителя Hoechst 33432, который представляет собой проникающий в клетки ядерный контрастный краситель, который испускает синюю флуоресценцию при связывании с дНК. 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.

ATP-lite. Клеточный уровень АТФ коррелирует с состоянием здоровья клетки и может быть с легкостью определен с использованием различных коммерчески доступных наборов. Смесь ATP-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 резоруфина, который продуцирует красный флуоресцентный сигнал. Жизнеспособные клетки непрерывно превращают резазурин в резоруфин, 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 резазурин/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 НерG2C3a
(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. Интернализованные 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 терапии, которые могут положительно регулировать указанный процесс, может обеспечить новые способы 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 НерG2C3a.

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 (Кат. № DY643) и в каждую лунку добавляли бессырьюточную среду с добавлением 5 мкг/мл ас-ЛПНП (Alexa Fluor 488-меченных Кат. № 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 волн возбуждения примерно 485 нм и длине волн 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 С1-С3 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 жизнью 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 супероксид-аниона, который быстро превращается в перекись водорода и гидроксильные радикалы. Нарушения пептидов, входящих в состав ферментативной системы NADPH-оксидазы, приводят 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 С форбол-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 EC₅₀ 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 существует 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 декстрагена 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 (dH₂O) непосредственно к одной из трех пробирок, содержащих лиофилизованный субстрат, и перемешивания для достижения растворения. Однократный реакционный буфер готовили путем разбавления 6 мл 10X реакционного буфера в 54 мл dH₂O. 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 dH₂O. 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 флуоресценовыми фильтрами (возд. 485/исп.535), для нескольких временных точек.

Связывание с Toll-подобными рецепторами и активация NF_κB (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 гематопоэза и инфекцию.

Измерение активации TLR в клетках RAW-BLUE

Мышьи 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 NF_κB и AP-1. При стимуляции TLR, клетки RAW-BLUE™ активируют NF_κB 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 ресусцинировали 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 (QUAHTM-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 NF_κB и AP-1. При использовании специфических агонистов TLR 2 или 4 (соответственно), клетки HEK-BLUE™ TLR2 и HEK-BLUE™ TLR4 активируют NF_κB 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 ресусцинировали 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 гематопоэза 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-1бета, 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 макрофагоподобными 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-1га, 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 РВМС ресуспенсировали 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-хемоатрактанов 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, опсонины и проокоагулянты, 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-индуктированным 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 деградацию 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 резоруфином флуоресценции обработанных полипептидом AARS лунок, деленную на связанную с резоруфином флуоресценции лунок, обработанных только ФСБ.

Пролиферация и продукция воспалительных цитокинов астроцитами человека

Уровень техники и терапевтическое значение. Астроциты человека (НА) представляют собой астровидные клетки, которые являются производными коры головного мозга человека. Их замораживают на втором пассаже и их можно культивировать и размножать до 10 удвоений популяции. НА 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 нейрологических 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 резоруфином флуоресценции обработанных полипептидом AARS лунок, деленную на связанную с резоруфином флуоресценцию лунок, обработанных только ФСБ.

Пролиферация и продукция воспалительных цитокинов клетками эндотелия

микрососудов легкого человек (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 хемоатрактантных цитокинов и молекул клеточной адгезии, которые обеспечивают ключевой сигнал для направления миграции лейкоцитов в легкое 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 reparации. 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 САМ на поверхности гранулоцитов и соответствующими гликопротеинами, присутствующими на эндотелии. Различные исследования показали, что молекула клеточной адгезии эндотелия Е-селектин может взаимодействовать с лигандами гранулоцитов, презентирующих гликан типа SLex для опосредования этапов прикрепления и качения в адгезионном каскаде. Последующие этапы каскада вовлекают взаимодействие экспрессируемыми 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 одни 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 резазурин, 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 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 процессе, называемый клеточной адгезией. Указанные белки, как правило, представляют собой трансмембранные рецепторы и состоят из трех доменов: внутриклеточного домена, который взаимодействует с цитоскелетом, трансмембранный домена и внеклеточного домена, который взаимодействует либо с другими молекулами CAM того же типа (гомофильтное связывание), либо с другими CAM или внеклеточным матриксом (гетерофильтное связывание). Большинство CAM принадлежит четырем 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 1,2×10⁵ 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 кальцеином АМ (6 мкл/мл; Invitrogen Кат. № C1430) и инкубировали в течение 30 мин. Меченные клетки собирали и ресуспендировали в среде RPMI, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, и плотность доводили до 2×10⁶ клеток/мл.

100 мкл (2×10⁵) меченых 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 (Анализы 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 глюкоза/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 пероксидом рецептор γ (PPAR γ) и связывающийся с энхансером ССААТ 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, секreтируются 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 HPAd (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% 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 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 резоруфином флуоресценции обработанных полипептидом AARS лунок, де-

ленную на связанный с резоруфином 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 пермеабилизировали 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 коммиттирование 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 трансформирующими фактором роста β 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 мемbrane миобластов, что указывает на функционирование биохимического пути "снаружи внутрь", в котором интегрин представляет собой более раннюю молекуларную 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, какексии, различных состояний, связанных с мышечной атрофией, также как и заболеваний скелетной мускулатуры, где мышечная атрофия играет ключевую роль в патогенезе и симптомологии. 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 (TC) 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 пермеабилизировали 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-Tek 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 гематопоэза, нейрогенеза, миогенеза, остеогенеза и адипогенеза, также как и в широком диапазоне нарушений и заболеваний, включая, например, воспалительные ответы, аутоиммунные заболевания, рак, нейроальную 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 размноживали 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. Произошедшие из тРНК-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 (hPASMC)

Уровень техники и терапевтическое значение. Гладкомышечные клетки легочной артерии (PASMC) 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 PASMC 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 (РН) связана с различными первичными состояниями, включая повышение легочного сопротивления периферических сосудов как результат повышения сосудистого тонуса и сократимости PASMC и ремоделирования сосудов. Ремоделирование сосудов включает рост PASMC, синтез материала матрикса и изменения во взаимодействиях клетка-клетка и клетка-матрикс в стенах малых легочных артерий (PA), что приводит к повышенной толщине гладкомышечного компонента стенки сосудов и нарушенной мускуляризации в норме не мускуляризованных дистальных РА. Указанный процесс вносит вклад в снижение диаметра просвета и повышение сопротивления периферических сосудов. Несмотря на то что конкретное участие PASMC в начальной 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 МНС, 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 PASMC результатом их собственных характеристик или димергегуляции молекулярных событий, которые управляют ростом PASMC, 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 PASMC, 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 HPASMC (Cell Applications Кат. № 352-05a) поддерживали в ростовой среде HPASMC (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 HPASMC, 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 пермеабилизации 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 волн возбуждения (Ex) 405 нм и длине волны испускания (Em) 450 нм. Общую окраску на актин оценивали путем использования окрашивания Al-

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

Анализ связывания полипептидов AARS с клетками (анализы Н1-Н10 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/автоиммунные заболевания/воспаления); клеток НерG2 (контроль метаболизма, захвата холестерина или метаболизма); клеток ТНР-1, Jurkat, Raji (иммуномодуляцию/хемотаксис/автоиммунные заболевания/воспаления), тромбоцитов (тромбоцитопоз), адипоцитов 3T3L1 (липогенез/метаболизм) и мышиных 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 Kat. № R96325) или FITC-меченные анти-His6-антитела (AbCam Kat. № 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".

Анализы 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, Kat. № 555754) и 0,5 мкл анти-V5-FITC-меченных антител (Invitrogen, R96325) или меченные FITC анти-His6-антител (AbCam Kat. № 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 меченные FITC анти-His6-антител (AbCam Kat. № 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 гематопоэза и циркулирующих цитокинов

Уровень техники и терапевтическое значение. Гематопоэз (В альтернативном варианте кроветворение или гемопоэз) представляет собой формирование клеточных компонентов крови. Все клеточные компоненты крови происходят из гематопоэтических 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 гематопоэз и регулировать

развитие стволовых клеток гематопоэза.

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 мегакариоцитопоэза 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 мышиной 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 инъектировали 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 ($10^3/\text{мкл}$). 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-основный, GST- α , GCP-2, GM-CSF, KC/GRO α , гаптоглобин, IgA, IFNy, 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, МРО, миоглобин, SAP, SGOT, SCF, RANTES, ТРО, 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.

Мышьи 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 центрифugирования 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 Pep-Trap (michrom) 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 (michrom). 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 МС сканом следует семь МС/МС 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 (SEQUEST) 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 аминоацил-tРНК-синтетазы идентифицировали с использованием высокоэффективного секвенирования библиотеки кДНК для транскриптов аминоацил-tРНК-синтетазы. Матрицы кДНК готовили из общих экстрактов РНК тканей, таких как мозг взрослого человека и эмбриона, и обогащенных аминоацил-tРНК-синтетазой транскриптов с использованием последовательностей праймеров, специфичных для всех отмеченных экзонов всех указанных человеческих аминоацил-tРНК-синтетаз и ассоциированных с ними белков.

Тотальную РНК человека получали из Clontech. Для образцов клеточной линии и ткани мыши,totальную 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 полиA+ 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 аминоацил-tРНК-синтетазы. Транскрипты, обогащенные генами аминоацил tРНК-синтетазы, амплифицировали с помощью мультиплексной ПЦР с использованием специфичной к экзону аминоацил-

тРНК-синтетазы кДНК и различных комбинаций праймеров экзонов аминоацил-тРНК-синтетазы.

Двухцепочечные транскриптомные продукты ПЦР, обогащенные аминоацил-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 аминоацил-тРНК-синтетазой для получения библиотеки кДНК для глубокого секвенирования с использованием набора для мультиплексного секвенирования Illumina. Вкратце, транскриптомные продукты ПЦР, обогащенные аминоацил-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 аминоацил-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 “Splice-map” (общедоступное для скачивания на [http://www-stat.stanford.edu/~kinfai/ SpliceMap/](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 экзонов аминоацил-тРНК-синтетазы, сравнивали с аннотированными экзонами соединений, и новые границы экзонов идентифицировали как варианты альтернативного сплайсинга.

Колонки в табл. 2, 5 и 8, обозначенные “5'-экзон” и “3'-экзон” указывают, какие экзоны (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 биоинформационных подходов. Аминокислотные последовательности полноразмерной человеческой аминоацил-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 массспектрометрии.

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 аминоацил-тРНК-синтетазы сравнивали между тканью мышиной печени и тканью мышиной поджелудочной железы. Экспрессию резектина аминоацил-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 аминоацил-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 аминоацил-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 аминоацил-тРНК-сингетазы (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 аминоацил-тРНК-сингетазы, затем исследовали методом твердофазного иммуноферментного анализа на предмет реактивности с фрагментами и с исходным, полноразмерным ферментом. Клоны, демонстрирующие предпочтительное связывание (например, в ≥ 10 раз повышенную аффинность) с фрагментами аминоацил-тРНК-сингетазы, дополнительно охарактеризовывали.

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

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 аминоацил-тРНК-сингетазы, 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 биоинформационического анализа, iv) доказательство дифференциальной экспрессии конкретных полипептидов AARS, v) доменная структура белка AARS, vi) размер полипептида AARS и vii) минимизация одинаковых дублирующихся последовательностей.

Таблица Е2

Полипептиды AARS, выбранные для кодон-оптимизации и бактериальной экспрессии

Название полипептида AARS	SEQ ID NO: для эпигенетично меченных полипептидов AARS	SEQ ID NO: для полинуклеотидов AARS	Остатки белка AARS	Положение эпигенетической 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
<hr/>					
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 ¹¹	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 113	191-333	N-концевое	2
HisRS1 ¹¹	SEQ ID NO: 112	SEQ ID NO: 113	191-333	С-концевое	2

Полинуклеотиды, кодирующие выбранные полипептиды AARS, перечисленные в табл. Е2, 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. Е2.

Пример 9.

Низкопроизводительная бактериальная экспрессия и очистка. Полипептиды AARS, перечисленные в табл. Е2, 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. Е3.

Таблица Е3

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	+	+
<hr/>			
HisRS1 ^{II}	N-концевое	+	++
HisRS1 ^{II}	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. Е4, 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. Е4.

Таблица Е4

Суммарные данные выхода и биофизической характеристики типичных полипептидов AARS

AARS полипептид	Положение эпитетопной 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 ^{II}	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^{H1} 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. Е5.

Таблица Е5

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 эпигенотипной 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 ^{H1}	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. Е5 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^{H1}, 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 Е6

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) /RPMI 8226	A3
Мезенхимальные стволовые клетки человека/hMSC	A4
Астроциты человека	A5
Клетки острого моноцитарного лейкоза человека/THP1	A6
Клетки аспираата 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. Произошедший из тРНК-сингтетазы 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 ацетилированного 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 значение 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 (hPASMC) (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 (hPASMC), 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/hPASMC (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/RPMI18226 (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 связанный 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 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 связанные с клетками интенсивность флуоресценции более, чем на 2 SD отличалась от контрольных значений для реагента для указанного типа клеток.

Таблица E7

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} (аминокодилоты 1-141), HisRS1^{N2} (аминокодилоты 1-408), HisRS1^{N3} (аминокодилоты 1-113), HisRS1^{N4} (аминокодилоты 1-60), HisRS1^{N5} (аминокодилоты 1-244 + 26 аа), HisRS1^{I1} (аминокодилоты 191-333), HisRS1^{C1} (аминокодилоты 405-509), HisRS1^{O2} (аминокодилоты 1-60 + 175-509), HisRS1^{O4} (аминокодилоты 1-100+211-509), HisRS1^{O6} (аминокодилоты 1-60+101-509), HisRS1^{O7} (аминокодилоты 1-100+211-509) обладают функциональной активностью.

лоты 1-100+175-509), HisRS1⁰⁸ (аминоксилоты 1-60+399-509), HisRS1⁰⁹ (аминоксилоты 1-100+399-509) и HisRS1^{C10} (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, ПОЛИПЕТИД АМИНОАЦИЛ-ТРНК-СИНТЕТАЗЫ (AARS)

<130> 120161.450PC

<140> РСТ
 <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		
aggagataaa acatatg		17
<210> 4		
<211> 14		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Олигонуклеотид		
<400> 4		
aggaggtaaa acat		14
<210> 5		
<211> 14		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Олигонуклеотид		
<400> 5		
aggagataaa 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
ggttaaggccta tcccttaaccc tctcctcggt ctcgattcta cgccaccacca tcatacaccat 60
taatgactcg ag 72

<210> 8
<211> 72
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Олигонуклеотид

<400> 8
catatgcata atcatcatca tcacggtaag cctatcccta accctctcct cggtctcgat 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
ctcgagggtta 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 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
Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val		80
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		
130	135	140

<210> 13

<211> 423

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 13

atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
 ctcagaagcagc agaaggccag cgcccagctg atcgaggagg aggtggcgaa actccctgaaa 120
 ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaaat ttgtgctcaa aacccccaag 180
 ggcacaagag actatagtcc ccggcagatg gcagttcgcg agaaggtgtt tgacgtaatc 240
 atccgttgct tcaaggcaca cggtgcaagaa gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag 300
 gaaacactga tgggaaagta tgggaaagac tccaagctt tctatgacct gaaggaccag 360
 ggcggggagc tcctgtccct tcgctatgac ctcactgttc cttttgcgtcg gtattttggca 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
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu		15
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
Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val		80
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 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
Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe		160
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	agggagagcgc	cgtgcgaggc	60
ctcaaggcagc	agaaggccag	cgccgagctg	atcgaggagg	aggtggcgaa	actcctgaaa	120
ctgaaggcac	agctgggtcc	tgatgaaagc	aaacagaaat	tttgctcaa	aacccccaag	180
ggcacaagag	actatagtcc	ccggcagatg	gcagttcgcg	agaaggtgtt	tgacgtaatc	240
atccgttgc	tcaaggcaca	cggtgcagaa	gtcattgata	cacctgtatt	tgaactaaag	300
gaaacactga	tgggaaagta	tggggaaagac	tccaaagctta	tctatgacct	gaaggaccag	360
ggcggggagc	tcctgtccct	tcgctatgac	ctcaactgttc	ctttgctcg	gtatttggca	420
atgaataaaac	tgaccaacat	taaacgctac	cacatagcaa	aggtataatcg	gcgggataac	480
ccagccatga	cccgtggccg	ataccgggaa	ttcttaccagt	gtgattttga	cattgctggg	540
aactttgatc	ccatgatccc	tgatgcagag	tgcctgaaga	tcatgtgcga	gatccctgagt	600
tcaacttcaga	taggcgactt	cctggtaaag	gtaaacgatc	gacgcattct	agatgggatg	660
tttgcttatct	gtgggtttc	tgacagcaag	ttccgtacca	tctgctctc	agtagacaag	720
ctggacaagg	tgtcctggga	agaggtgaag	aatgagatgg	tgggagagaa	ggcccttgca	780
cctgaggtgg	ctgaccgcata	tggggactat	gtccagcaac	atggtgggt	atccctggtg	840
gaacagctgc	tccaggatcc	taaactatacc	caaaaacaagc	aggccttgg	ggccctggga	900
gacctgaagt	tgctcttga	gtacctgacc	ctatttggca	ttgatgacaa	aatctcctt	960
gacctgagcc	ttgctcgagg	gctggattac	tacactgggg	tgatctatga	ggcagtgtcg	1020
ctacagaccc	cagcccgaggc	aggggaagag	cccctgggt	tgggcagttgt	ggctgctgga	1080
ggacgctatg	atgggctagt	gggcatgttc	gaccggaaag	ggcgcaaggt	gccatgtgt	1140
gggctcagca	ttgggggtgga	gcggattttc	tccatcgtgg	aacagagact	agaggcttt	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 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

<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*

```

<400> 23
Glu Thr Leu Thr Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys Leu Ile Tyr Asp
      1          5          10          15
Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg Tyr Asp Leu Thr
      20          25          30
Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu Thr Asn Ile Lys
      35          40          45
Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn Pro Ala Met Thr
      50          55          60
Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe Asp Ile Ala Gly
      65          70          75          80
Gln Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu Lys Ile Met Cys
      85          90          95
Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asn Phe Leu Val Lys Val Asn
      100         105         110
Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Val Cys Gly Val Pro Asp
      115         120         125
Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val
      130         135         140
Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu Lys Gly Leu Ala
      145         150         155         160
Pro Glu Val Ala Asp Arg
      165

```

<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	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
 ctcAACGcAGC agaaggccAG cgCCGAGCTG atcGAGGAGG aggtggcgAA actcctgaaa 120
 ctGAAGGcAC agctgggtcc tGATGAAAGC aaacAGAAAT ttGTGCTCAA AACCCCCAAG 180

<210> 28

<211> 270

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met	Ala	Glu	Arg	Ala	Ala	Leu	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	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	gtgaaaacttc	agggagagcg	cgtgcgaggc	60
ctcaaggcagc	agaaggccag	cgccgagctg	atcgaggagg	aggtggcgaa	actcctgaaa	120
ctgaaggcac	agctgggtcc	tcatgaaagc	aaacagaaat	ttgtgctcaa	aacccccaag	180
ggcacaagag	actatagtcc	ccggcagatg	gcagttcgcg	agaaggtgtt	tgacgtaatc	240
atccgttgc	tcaagcgcca	cggtgcagaa	gtcattgata	cacctgtatt	tgaactaaag	300
gaaacactga	tggaaaagta	tggggaaagac	tccaaagcta	tctatgacct	gaaggaccag	360
ggcggggagc	tcctgtccct	tcgcttatgac	ctcaactgttc	cttttgcctcg	gtatggca	420
atgaataaaac	tgaccaacat	taaacgctac	cacatagcaa	aggtataatcg	gcgggataaac	480
ccagccatga	cccgtggccg	ataccggaa	ttctaccagt	gtgattttga	cattgctggg	540
aactttgatc	ccatgatccc	tgatgcagag	tgcctgaaga	tcatgtgcga	gatccctgagt	600
tcacttcaga	taggcgactt	cctggtaaag	gtaaacgatc	gacgcattct	agatgggatg	660
tttgcttatct	gtgggttttc	tgacagcaag	ttccgtacca	tctgctcctc	agtagacaag	720
ctggacaagg	tgggttatcc	ctgggtggaa	agctgctcca	ggatcctaaa	ctatccaaa	780
acaagcagggc	cttggaggggc	ctgggagacc	tga			813

<210> 30

<211> 50

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 30
gaaatttgtc ctc当地accc ccaagtagag acgaggttc accatgttgg 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
ctc当地cagta gacaagctgg acaagggtgg 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 gtgc当地cgct ggaggagctg gt当地aaacttc agggagagcg cgtgc当地ggc 60
ctcaaggcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggc当地aa actc当地t当地aaa 120

ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaaat ttgtgctcaa aacccccaag 180
 ggcacaagag actatagtcc ccggcagatg gcagttcgcg agaagggtgtt tgacgtaatc 240
 atccgttgct tcaaggcca cgggtcagaa gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag 300
 gaaacactga tggaaaagta tggggaaagac 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 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 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 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	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	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

<211> 432

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-сингтетазы, содержащий
С-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 39

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	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	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Asn	Glu	Met	Val
			245			250					255				
Gly	Glu	Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr
			260			265					270				
Val	Gln	Gln	His	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp
			275			280					285				
Pro	Lys	Leu	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu
			290			295					300				
Lys	Leu	Leu	Phe	Glu	Tyr	Leu	Thr	Leu	Phe	Gly	Ile	Asp	Asp	Lys	Ile
			305			310					315				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 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 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 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
Val Ile Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr		80
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 His		
130	135	

<210> 42

<211> 294

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-сингетазы, содержащий
N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 42

Met His His His His Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu		
1	5	10
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
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
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
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-сингтетазы, 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-сингтетазы

<400> 44

```
ggatccgcag aacgtgccgc cctggaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
ggtctgaaac agcagaaaagc aagcgctgaa ctgatcgaag aagaagtggc gaaactgctg 120
aaactgaaag cacagctggg tcctgtatcaa tcaaaaacaaa aattcgtcct gaaaactccg 180
aaaggaaccc gtgacttattc tcctcgtaaa atggccgtcc gtgaaaaagt gttcgacgtg 240
```

atcattcgct gctttaaacg ccatgggcc gaagtgattg ataccccggt gtttgagctg 300
 aaagagacac tcatggcaaa atatggtag gacagcaaac tgatttatga cctgaaaagat 360
 cagggtggtg aactgcttag tctgcgtat gatctgacag ttccgttgc ccgttatctg 420
 gcaatgctcg ag 432

<210> 45

<211> 1233

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид гистидил-тРНК-синтетазы

<400> 45

ggatccgcag aacgtgccgc cctggaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
 ggtctgaaac agcagaaagc aagcgctgaa ctgatcgaag aagaagtggc gaaaactgctg 120
 aaactgaaag cacagctggg tcctgatgaa tcaaaaacaaa aattcgtccct gaaaactccg 180
 aaaggaaccc gtgactattc tcctcgtaa atggccgtcc gtgaaaaagt gttcgacgtg 240
 atcattcgct gctttaaacg ccatgggcc gaagtgattg ataccccggt gtttgagctg 300
 aaagagacac tcatggcaaa atatggtag gacagcaaac tgatttatga cctgaaaagat 360
 cagggtggtg aactgcttag tctgcgtat gatctgacag ttccgttgc ccgttatctg 420
 gcaatgaata aactgaccaa cattaaacgc tattcacattt ctaaagtcta tcgcccgtgac 480
 aatcctgcta tgaccgtgg tcgttatcgt gagttctatc agtgtgaatt cgatattgcc 540
 ggcaactttg atccgatgat cccggatgct gaatgcgtga aaatcatgtg tgagatcctg 600
 agcagtctgc agattggcga tttcctgggt aaagtcaacg atcgccgtat tctggatggc 660
 atgttcgcca tctgtgggt tagcgactcc aaattccgtt ccattctgtat tagtgtggac 720
 aaactggata aagttagctg ggaggaggtg aaaaacgaaa tggtggcga gaaaggctcg 780
 gctcctgaag tggctgaccg tattggtag tatgtccagc agcacgggtgg agtatactg 840
 gttgagcaac tgctgcaaga ccctaaactg agtcagaata aacaggccct ggagggactg 900
 ggagatctga aactgctgtt cgagttatctg accctgtcg gtatcgatga caaaatctcc 960
 tttgacctgt cactggctcg tggactggac tattataccg gcgtgatcta tgaagctgta 1020
 ctgctgcaaa ctccagcaca agcaggtgaa gagcctctgg gtgtgggt tagtagccgct 1080
 gggggacgtt atgatggact ggtggggatg ttcgacccta aaggccgtaa agtccgtgt 1140
 gtgggtctga gtatcggtgt tgagcgtatc ttttccatcg tcgagcaacg tctggaaagca 1200
 ctggaggaaa aaatccgtac gaccgaactc gag 1233

<210> 46

<211> 348

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид гистидил-тРНК-синтетазы

<400> 46

ggatccgcag aacgtgccgc cctggaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
 ggtctgaaac agcagaaagc aagcgctgaa ctgatcgaag aagaagtggc gaaaactgctg 120
 aaactgaaag cacagctggg tcctgatgaa tcaaaaacaaa aattcgtccct gaaaactccg 180
 aaaggaaccc gtgactattc tcctcgtaa atggccgtcc gtgaaaaagt gttcgacgtg 240
 atcattcgct gctttaaacg ccatgggcc gaagtgattg ataccccggt gtttgagctg 300
 aaagagacac tcatggcaaa atatggtag gacagcaaac tgctcgag 348

<210> 47

<211> 819

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид гистидил-тРНК-синтетазы

<400> 47

ggatccgcag aacgtgccgc cctggaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
 ggtctgaaac agcagaaagc aagcgctgaa ctgatcgaag aagaagtggc gaaaactgctg 120

aaactgaaag cacagctggg tcctgatgaa tcaaaacaaa aattcgtcct gaaaactccg 180
 aaaggaacc cgtacttac tcctcgtaa atggccgtcc gtgaaaaagt gttcgacgtg 240
 atcattcgct gctttaaacg ccatggtgcc gaagtgattg ataccccgt gtttgagctg 300
 aaagagacac tgatggcaa atatggtag gacagcaaac tgatctatga cctgaaagac 360
 caaggcggtg aactgctgtc cctgcgttat gatctgactg tgccgttgc ccgttatctg 420
 gccatgaata aactgacgaa cattaaacgc tatcacattg ccaaagtgtc tcgcccgtac 480
 aatcctgcta tgactcgtag acgttatctg gaattctatc agtgtgactt cgatattgcc 540
 ggcaacttcg accctatgtat tccggatgtc gaatgcctga aaatcatgtc tgagatcctg 600
 agcagcctgc aaattggta cttcctggtg aaagtgaatg accgtcgat cctggatggc 660
 atgttgcca tttgtggtgt gagcgattcc aaattccgtaa ccatctgttag tagtgtggac 720
 aaactggata aagtggctaa tccgtggtag aactcttgta gccgtattct gaactatcct 780
 aaaaccagcc gcccgtggcg tgcttggaa 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 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
ctcaaggcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
gattttgaca ttgctggaa ctttgatccc atgatccctg atgcagagtg cctgaagatc 240
atgtgcgaga tcctgagttc acttcagata ggcgacttcc tggtaaaggtaa acacgatcga 300
cgcattctag atggatgtt tgcttatctgt ggtgtttctg acagcaagtt ccgtaccatc 360
tgctcctcag tagacaagct ggacaagggtg tcctggaaag aggtgaagaa tgagatggtg 420
ggagagaagg gccttgcacc tgaggtggct gaccgcattt gggactatgt ccagcaacat 480
ggtggggatcc ctgttgttggaa acagctgttc caggatccta aactatccaa aaacaaggcag 540
gccttggagg gccttggaga cctgaagtttgc ctctttgagt acctgaccctt atttggcatt 600
gatgacaaaa ttcctttga cctgagccctt gctcgagggc tggattacta cactgggggtg 660
atctatgagg cagtgtgtt acagacccca gcccaggcag gggaaagagcc cctgggtgtg 720
ggcagtgtgg ctgttgttggagg acgctatgtt gggctagtgg gcatgttcga ccccaaagg 780
cgcaagggtgc catgtgttggg gctcagcattt ggggtggagc ggattttctc catcgtggaa 840
cagagacttag aggctttggaa ggagaagata cggaccacgg agacacaggt gcttggca 900
tctgcacaga agaagctgtt agagggaaaga ctaaaagcttg tctcagaact gtgggatgtt 960
gggatcaagg ctgagctgtt gtacaagaag aacccaaagc tactgaacca gttacagttac 1020
tgtgaggagg caggcatccc actgggtggct atcatcggcg agcaggaact caaggatggg 1080
gtcatcaagc tccgttcaagt gacgagcagg gaagagggtgg atgtccgaag agaagacctt 1140
gtggaggaaa tcaaaaaggag 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 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
 ctcagaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
 ctgaaggcac agctgggtcc tcatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aaccccccaag 180
 gtaaacgatc gacgcattct agatggatg tttgctatct gtgggtgttgc tgacagcaag 240
 ttccgtacca tctgctcctc agtagacaag ctggacaagg tgtcctggga agaggtgaag 300
 aatgagatgg tgggagagaa gggccttgcg cctgaggtgg ctgaccgcat tgggactat 360
 gtccagcaac atgggggtt atccctgggt gaacagctgc tccaggatcc taaactatcc 420
 caaaacaagc aggcccttgggaa gggccttgggaa gacctaagt tgctcttgc gtacctgacc 480
 ctatggcata ttgatgacaa aatctcctt gacctgagcc ttgctcgagg gctggattac 540
 tacactgggg tcatcttatgc ggcagtgcgt ctacagaccc cagcccaaggc aggggaagag 600
 cccctgggtt tgggcaatgtt ggctgctggaa ggacgcctatg atgggctatgtt gggcatgttc 660
 gaccccaaaag ggcgcaaggt gccatgtgtt gggctcagca ttgggggtggaa gcccgtttc 720
 tccatcggtt aacagagact agaggctttt gaggagaaga tacggaccac ggagacacag 780
 gtgcttgtgg catctgcaca gaagaagctg ctagaggaaa gactaaagct tgcgtcagaa 840
 ctgtggatgtt ctggatcaa ggctgagctg ctgtacaaga agaaccctaaa gctactgaac 900
 cagttacagt actgtgagga ggcaggcatc ccactgggtt gatatcatcg cgagcaggaa 960
 ctcaggatgtt gggatcatcaa gtcgggttca gtgacgagca gggaaagaggtt ggtatgtccga 1020
 agagaagacc ttgtggagga aatcaaaaagg agaacaggcc agccctctgtt catctgttca 1080

<210> 52

<211> 399

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 52

Met	Ala	Glu	Arg	Ala	Ala	Leu	Glu	Leu	Val	Lys	Leu	Gln	Gly	Glu
1						5			10			15		
Arg	Val	Arg	Gly	Leu	Lys	Gln	Gln	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	380													
Val	Glu	Glu	Ile	Lys	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Pro	Leu	Cys	Ile	Cys	
385	390	395													

<210> 53

<211> 1200

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 53

atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
 ctcagaaggcag agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
 ctgaaggcac agctgggtcc tcatgaaagc aaacagaaaat ttgtgctcaa aacccttcaag 180
 ggcacaagag actatagtcc ccggcagatg gcagttcgcg agaagggttt tgacgtaatc 240
 atccgttgc tcaagcgcca cggtgccagaa gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag 300
 gtaaacgatc gacgattct agatggatg tttgttatct gtgggtttc tgacagcaag 360
 ttccgttcca tctgttccatc agtagacaag ctggacaagg tggcttggaa agaggtgaag 420
 aatgagatgg tgggagagaa gggcatttgc cttgaggtgg ctgaccgcat tggggactat 480

gtccagcaac atggggggtt atccctgggtt gaacagctgc tccaggatcc taaaactatcc 540
 caaaacaaggc aggccttggc gggcctggc gacctaagt tgctcttgc gtacctgacc 600
 ctattttggca ttgatgacaa aatcttcctt gacctgagcc ttgctcgagg gctggattac 660
 tacactgggg tgatctatga ggcagtgcgtc ctacagaccc cagcccaggc aggggaagag 720
 cccctgggtt tggcagtgt ggctgctggc ggacgctatg atgggctagt gggcatgttc 780
 gaccccaaag ggcgaaggc gccatgtgtc gggctcagca ttgggggtggc gcggatttc 840
 tccatcgtgg aacagagact agaggcttg gaggagaaga tacggaccac ggagacacag 900
 gtgcttgtgg catctgcaca gaagaagctg ctagaggaaa gactaaagct tgtctcagaa 960
 ctgtgggatgtt ctggatcaa ggctgagctg ctgtacaaga agaacccaa gctactgaac 1020
 cagttacagt actgtgagga ggcaggcatc ccactgggtgg ctatcatcgg cgagcaggaa 1080
 ctcaaggatg gggcatcaa gctccgttca gtgacgagca gggaaagaggt ggatgtccga 1140
 agagaagacc ttgtggagga aatcaaaaagg agaacaggcc agccctctg 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 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 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
 ctcaaggcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
 ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
 ggcacaagag actatagtcc cccgcagatg gcagttcgcg agaagggttt tgacgtaatc 240
 atccgttgc tcaagcgcca cgggtcagaa gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag 300
 gaaacactga tgggaaagta tggggaaagac tccaagctt tctatgaccc gaaggaccag 360
 ggcggggagc tcctgtccct tcgctatgac ctcactgtt ctttgctcg gtatggca 420
 atgaataaac tgaccaacat taaacgctac cacatagcaa aggtatatacg gcgggataac 480
 ccagccatga cccgtggccg ataccggaa ttctaccagt gtgtaaacga tcgacgcatt 540
 ctagatggta tgtttgc tatctgtgtt tctgacagca agttccgtac catctgctcc 600
 tca tagatgaca agctggacaa ggtgtcctgg gaagaggtga agaatgagat ggtgggagag 660
 aagggccttg cacctgaggt ggctgaccgc attggggact atgtccagca acatggtggg 720
 gtatccctgg tggAACAGCT gctccaggat cctaaactat cccaaaacaa gcaggccctt 780
 gagggcctgg gagacactgaa gttgctt gacttacatc ccctatttgg catttatgac 840
 aaaatctcct ttgacactgag ctttgcgtc gggctggatt actacactgg ggttatctat 900
 gagggcgtgc tgctacagac cccagcccag gcagggaaag agcccttggg tggggcagt 960
 gtggctgctg gaggacgcta tggatggctt gtcggcatgt tcgacccaa agggcgcaag 1020
 gtgccatgtg tggggctcag cattgggtt gagcggattt tctccatctgt ggaacagaga 1080
 ctagaggcctt tggaggagaa gatacggacc acggagacac aggtgcttgtt ggcattctgca 1140
 cagaagaaggc tgcttagagga aagactaaag cttgtctcg aactgtggga tggggatc 1200
 aaggctgaggc tgctgtacaa gaagaaccca aagctactga accagttaca gtactgtgag 1260
 gagggcaggca tcccactggt ggctatcatc ggcgagcagg aactcaagga tgggtcattc 1320
 aagctccgtt cagtgacgag cagggaaagag gtggatgtcc gaagagaaga cttgtggag 1380
 gaaatcaaaa ggagaacagg ccagccctc tgcattctgtt 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 agggagagcgt cgtgcgaggc 60

ctcagaaggcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
 ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aaccffffcaag 180
 gaaacactga tggaaagta tggggaaagac tccaagctt tctatgacct gaaggaccag 240
 ggcggggagc tcctgtccct tcgctatgac ctcactgttc cttttgctcg gtatttggca 300
 atgaataaaac tgaccaacat taaacgctac cacatagcaa aggtatatcg gcgggataac 360
 ccagccatga cccgtggccg ataccggaa ttctaccagt gtgatttga cattgctggg 420
 aactttgatc ccatgatccc tgatgcagag tgcctgaaga tcatgtgcga gatcctgagt 480
 tcacttcaga taggcgactt cctggtcaag gtaaacgatc gacgcattct agatgggatg 540
 ttgcttatct gtgggtttc tgacagcaag ttccgtacca tctgctcctc agtagacaag 600
 ctggacaagg tgcctggga agaggtgaag aatgagatgg tgggagagaa gggccttgca 660
 cctgaggtgg ctgaccgcatt tggggactat gtccagcaac atgggtgggt atccctggtg 720
 gaacagctgc tccaggatcc taaactatcc caaaacaagc aggcccttggaa gggccttggg 780
 gacctgaagt tgctcttga gtacctgacc ctattggca ttgatgacaa aatctccctt 840
 gacctgagcc ttgctcgagg gctggattac tacactgggg tcatctatga ggcagtgctg 900
 ctacagaccc cagccaggc aggggaagag cccctgggtg tgggcagtgt ggctgctgga 960
 ggacgctatg atgggctagt gggcatgttc gaccccaaag ggcgcaaggt gcoatgtgtg 1020
 gggctcagca ttgggggttgc ggggatttc tccatcgtgg aacagagact agaggcttg 1080
 gaggagaaga tacggaccac ggagacacag gtgcttgcgtt catctgcaca gaagaagctg 1140
 cttagagaaaa gactaaagct tgcctcagaa ctgtggatgt ctgggatcaa ggttgagctg 1200
 ctgtacaaga agaacccaaa gctactgaac cagttacagt actgttgagga ggcaggcatc 1260
 ccactggtggttgc ctatcatcggttgc cggcggggatgttgc gggcatcaaa gctccgttca 1320
 gtgacgagca gggaaagaggt ggttgccgaa agagaagacc ttgtggagga aatcaaaagg 1380
 agaacaggcc agccctctg catctgctga 1410

<210> 58

<211> 435

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 58

Met	Ala	Glu	Arg	Ala	Ala	Leu	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	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
 ctcaaggcagc agaaggccag cgcccagctg atcgaggagg aggtggcgaa actccctgaaa 120
 ctgaaggcac agctgggtcc ttagtggaaacaa acacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
 ggcacaagag actatagtcc ccggcagatg gcagttcgcg agaagggtgt tgacgtaatc 240
 atccgttgct tcaagcgcca cggtgcagaa gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag 300
 gattttgaca ttgctggaa ctttgatccc atgatccctg atgcagagtg cctgaagato 360
 atgtgcgaga tcctgagttc acttcagata ggcgacttcc tggtaaggt aaacgatcga 420
 cgcattctag atggatgtt tgcttatctgt ggtgtttctg acagcaagtt ccgtaccatc 480
 tgctcctctag tagacaagct ggacaagggtg tcctggaaag aggtgaagaa tgagatggtg 540
 ggagagaagg gccttgcacc tgagggtggc gaccgcattt gggactatgt ccagcaacat 600
 ggtgggttat ccctgggtga acagctgcgc caggatccta aactatccca aaacaaggcag 660
 gccttggagg gcctgggaga cctgaagtttgc ctctttgagt acctgacccct atttggcatt 720
 gatgacaaaaa ttcctttga cctgagccctt gctcgaggc tggattacta cactgggttg 780
 atctatgagg cagtgcgtc acagacccca gcccaggcag gggaaagagcc cctgggtgtg 840
 ggcagtgtgg ctgctggagg acgctatgtat gggctagtgg gcatgttcga ccccaaagg 900
 cgcagggtgc catgtgtggg gctcagcatt ggggtggagc ggattttctc catcggtggaa 960
 cagagactag aggcttggaa ggagaagata cggaccacgg agacacaggt gcttggc 1020
 tctgcacaga agaaggctgtc agaggaaaaga ctaaaagctt tctcagaact gtggatgtc 1080
 gggatcaagg ctgagctgtc gtacaagaag aacccaaagc tactgaacca gttacagttac 1140
 tgtgaggagg caggcatccc actgggtggc atcatcgccg agcaggaact caaggatggg 1200
 gtcatcaagc tccgttcagt gacgagcagg gaagagggtgg atgtccgaag agaagacctt 1260
 gtggaggaaa tcaaaaaggag aacaggccag cccctctgca 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 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
 ctcaaggcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
 ctgaaggcac agctgggtcc ttagtggaaat aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
 gctttggagg agaagatacg gaccacggag acacaggtgc ttgtggcatc tgacacagaag 240
 aagctgctag agggaaagact aaagcttgtc tcagaactgt gggatgtctgg gatcaaggct 300
 gagctgctgt acaagaagaa cccaaagcta ctgaaccagt tacagtactg tgaggaggca 360
 ggcattccac tggtgctat catcgccgag caggaactca aggatggggt catcaagctc 420
 cgttcagtga cgagcaggaa agaggtggat gtccgaagag aagaccttgt ggaggaaatc 480
 aaaaggagaa caggccagcc cctctgcatt tgctga 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 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 gtgaaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
ctcaaggcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
ctgaaggcac agctgggtcc tcatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaag 180
ggcacaagag actatagtcc ccggcagatg gcagttcgcg agaagggttt tgacgtaatc 240
atccgttgc tcaaggcaca cggtgccagaa gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag 300
gctttggagg agaagatacg gaccacggag acacaggtgc ttgtggcatc tgcacagaag 360
aagctgctag aggaaagact aaagcttgc tcagaactgt gggatgtgg gatcaaggct 420
gagctgctgt acaagaagaa cccaaagcta ctgaaccagt tacagtactg tgaggaggca 480
ggcatccccac tggtgctat catcggcgag caggaactca aggatggggt catcaagctc 540
cgttcagtga cgagcaggga agaggtggat gtccgaagag aagaccttgt ggagggaaatc 600
aaaaggagaa caggccagcc cctctgcatc 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 caaggtgccca tgtgtggggc tcagcattgg ggtggagcgg 60

030418

attttctcca tcgtggaaca gagactagag gcttgaggagg agaagatacg gaccacggag 120
acacagggtgc ttgtgcattc tgcacagaag aagctgctag agggaaagact aaagcttgtc 180
tcagaactgt gggatgctgg gatcaaggct gagctgctgt acaagaagaa cccaaagcta 240
ctgaaccagt tacagtaactg tgaggaggca ggcattccac tggtggttat catcggcgag 300
caggaactca aggatggggt catcaaggctc cgttcagtga cgagcaggga agaggtggat 360
gtccgaagag aagaccttgt ggaggaaatc aaaaggagaa caggccagcc cctctgcata 420
tgctga 426

<210> 66

<211> 50

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 66

gaaatttgtg ctcaaaaaccc ccaaggattt tgacattgct gggaaactttg 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 ctcaaaaaccc 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

tgatacacacct 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 cgatcgacgc 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 ctc当地accc 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
tgatacacacct gtatttgaac taaaggattt tgacattgct ggaaactttg 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 ctc当地accc ccaaggctt 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															15

<210> 80

<211> 50

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 80

tgatacacacct	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															15

<210> 82

<211> 50

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 82

ctcctcagta	gacaagctgg	acaagggtggg	gtatccctgg	tggaacacagct	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															15	
Leu	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Trp	Asp	Ala	Gly	Ile	
															20	
Lys	Ala	Glu	Leu	Leu	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Leu	Asn	Gln	Leu	25	
															30	
35															40	
Gln	Tyr	Cys	Glu	Glu	Ala	Gly	Ile	Pro	Leu	Val	Ala	Ile	Ile	Gly	Glu	45
															50	
50															55	
Gln	Glu	Leu	Lys	Asp	Gly	Val	Ile	Lys	Leu	Arg	Ser	Val	Thr	Ser	Arg	60
															65	
65															70	
Glu	Glu	Val	Asp	Val	Arg	Arg	Glu	Asp	Leu	Val	Glu	Glu	Ile	Lys	Arg	75
															80	
85															90	
Arg	Thr	Gly	Gln	Pro	Leu	Cys	Ile	Cys							95	
															100	
100															105	

<210> 84

<211> 318

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 84

cggaccacgg agacacaggt gcttggca tctgcacaga agaagctgct agaggaaaga 60
 ctaaagcttg tctcagaact gtggatgct gggatcaagg ctgagctgct gtacaagaag 120
 aacccaaagc tactgaacca gttacagtac tgtgaggagg caggcatccc actggtgct 180
 atcatcgccg agcaggaact caaggatggg gtcatcaagc tccgttcaagt gacgagcagg 240
 gaagaggtgg atgtccgaag agaagacctt gtggaggaaa tcaaaaaggag 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	Gly	Lys	Pro	Ile	Pro	Asn	Pro	Leu	Leu			
1														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															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-сингтетазы, содержащий N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 87

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	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
						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	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
						85			90			95		
Ala	Glu	Cys	Leu	Lys	Ile	Met	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln
						100			105			110		
Gly	Asp	Phe	Leu	Val	Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly
						115			120			125		
Phe	Ala	Ile	Cys	Gly	Val	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Arg	Thr	Ile	Cys
						130			135			140		Ser
Ser	Val	Asp	Lys	Leu	Asp	Lys	Val	Ser	Trp	Glu	Val	Lys	Asn	Glu
						145			150			155		160
Met	Val	Gly	Glu	Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile
						165			170			175		Gly
Asp	Tyr	Val	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
						195			200			205		
Asp	Leu	Lys	Leu	Leu	Phe	Glu	Tyr	Leu	Thr	Leu	Phe	Gly	Ile	Asp
						210			215			220		Asp
Lys	Ile	Ser	Phe	Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Tyr	Tyr
						225			230			235		Thr
Gly	Val	Ile	Tyr	Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Gln	Thr	Pro	Ala	Gln	Ala
						245			250			255		Gly
Glu	Glu	Pro	Leu	Gly	Val	Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Arg	Tyr
						260			265			270		Asp
Gly	Leu	Val	Gly	Met	Phe	Asp	Pro	Lys	Gly	Arg	Lys	Val	Pro	Cys
						275			280			285		Val
Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Val	Glu	Arg	Ile	Phe	Ser	Ile	Val	Glu	Gln
						290			295			300		Arg
Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Lys	Ile	Arg	Thr	Thr	Glu	Thr	Gln	Val
						305			310			315		Leu
Val	Ala	Ser	Ala	Gln	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	Leu
						325			330			335		Val
Ser	Glu	Leu	Trp	Asp	Ala	Gly	Ile	Lys	Ala	Glu	Leu	Leu	Tyr	Lys
						340			345			350		Lys
Asn	Pro	Lys	Leu	Leu	Asn	Gln	Leu	Gln	Tyr	Cys	Glu	Glu	Ala	Gly
						355			360			365		Ile
Pro	Leu	Val	Ala	Ile	Ile	Gly	Glu	Gln	Glu	Leu	Lys	Asp	Gly	Val
						370			375			380		Ile

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-сингетазы, 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		400
405	410	415
His His His		

<210> 89
<211> 383
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид гистидил-тРНК-сингтетазы, содержащий N-концевую аффинную метку 6xHis

400	89	
Met His His His His Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu		
1	5	10
Gly Leu Asp Ser Thr Gly Ser Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu		15
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 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 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-сингтетазы, 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	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	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 His		
370	375	380

<210> 91
<211> 423
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид гистидил-тРНК-сингетазы, содержащий N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 91	Met His His His His His Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu	15
1	5	10
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	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	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	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	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-сингетазы, 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	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	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	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			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
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		
420		

<210> 93

<211> 497

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-сингтетазы, содержащий N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 93

Met His His His His Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu		
1	5	10
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
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
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
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 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
Ile Tyr Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu		
325	330	335

Pro Leu Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu
 340 345 350
 Val Gly Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu
 355 360 365
 Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu
 370 375 380
 Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala
 385 390 395 400
 Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu
 405 410 415
 Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro
 420 425 430
 Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu
 435 440 445
 Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu
 450 455 460
 Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu
 465 470 475 480
 Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys Leu
 485 490 495
 Glu

<210> 94

<211> 497

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-синтетазы, содержащий С-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 94

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

<210> 97

<211> 459

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид гистидил-тРНК-сингетазы, содержащий N-концевую аффинную метку 6xHis

<400> 97

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	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	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-сингтетазы, 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 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 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			
165			

<210> 101

<211> 327

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид гистидил-тРНК-синтетазы

<400> 101

```
ggatccccgtacccaccgaaac ccaagttctggttgcctcag ctcagaaaaactgctggaa 60
gaacgcctgaaactggttag cgaactgtgg gatgctggca ttaaagccga actgctgtat 120
aaaaaaaaacc cgaaactgct gaatcagctg cagtattgtg aggaagcggg tattcctctg 180
gtggccattatcgagaaca ggaactgaaa gacggcgttataaactgctg tagcgtgacc 240
tctcgtgaag aagttgacgt tcgcccgtgaa gatctggctg aggaaatcaa acgtcgtacc 300
ggtaaacctctgtgttgcctcgag 327
```

<210> 102

<211> 1194

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид гистидил-тРНК-синтетазы

<400> 102

```
ggatccgcaggaaacgtgccgc cctggaaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
ggctgaaac acgagaaagc aagcgctgaa ctgatcgaag aagaagtggc gaaaactgctg 120
aaactgaaag cacagctggg tcctgatgaa tcaaaacaaa aattcgccct gaaaactccg 180
aaagacttcg atattgcggg gaattttgac cctatgatcc ctgatgccga atgtctgaaa 240
atcatgtgtg agatcctgag cagtctgcag attggtgact tcctggtaa agtgaacgat 300
cgccgtattctggatgtaat gtttgcatttgtgcgttgcacagcaa atttcgtacg 360
atctgttagca gcgtgataaa actggataaa gtgagctggg agggaggtgaa aaatgagatg 420
gtgggcgaaa aaggcttggc acctgaaatg gctgaccgtt tcgggtattatcggc 480
catggcggtt tttctctggcgtt cgaacagctg ctgcaagacc caaaaactgag ccagaacaaa 540
caggcactgg aaggactggg tggatctgaaa ctgctgttttgcgttgcacagcaa 600
atcgatgaca aaatctgtt tgacctgagc ctggcacgtt gtctggatta ttataccggc 660
gtgatctatg aagccgtccct gctgcaaaact ccagcacaag caggtgaaga acctctgggt 720
gttggtagtg tagcggcagg cggacgttat gatggactgg tggggatgtt tgatccgaaa 780
ggccgtaaag ttccgtgtt cggctgttgcgtt atcgggggttgcgttatctt tagcattgtg 840
gagcaacgttc tggaaagctt ggaggaaaaatccgttacca ccgaaaccca agttctgggt 900
gcctcagtc agaaaaaaact gctggaaagaa cgcctgaaac tggtagcga actgtgggt 960
gctggcattaa aagccgaact gctgtataaaa aaaaaaccgaa aactgctgaa tcagctgcag 1020
tattgtgagg aagcgggttat tcctctgggtt gccattatcg gagaacagga actgaaagac 1080
ggcggttattaa aactgcgtt cgtgacctt cgtgaagaat ttgacgttcg ccgtgaagat 1140
ctggtcgagg aaatcaaacgt tcgtaccgtt caacctctgtt gtattgcctt cgag 1194
```

<210> 103

<211> 1086

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид гистидил-тРНК-синтетазы

<400> 103

ggatccgcag aacgtgccgc cctggaaagag ctggtaaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
 ggtctgaaac agcagaaaagc aagcgctgaa ctgatcgaag aagaagtggc gaaaactgctg 120
 aaactgaaag cacagctggg tcctgatgaa tcaaaaacaaa aattcgtcct gaaaactccg 180
 aaagtgaatg atcgccgtat cctggatggc atgtttgcca tttgtggtgt gagcgactcg 240
 aaattccgta cgatttgctc tagcgtcgat aaactggaca aagtgtcctg ggaagaggtg 300
 aaaaacgaga tggtggtga gaaaggctcg gctcctgaag ttgccgaccg tattgggtat 360
 tatgttcagc agcatggcgg tggttcactg gttgaacaac tgctgcaaga cccgaaaactg 420
 tctcagaata aacaggcgt ggaaggactg ggagatctga aactgctgtt tgtagtatctg 480
 accctgttcg gcattgatgaa caaaatcagc ttgcaccta gcttgcacg tggtctggat 540
 tattataccg gcgtgatcta tgaagccgtt ctgctgcaga caccagcaca agcaggcgaa 600
 gaacctctgg gtgttgggtc tggcgcagcc ggtggctgtt atgatggact ggtaggcatg 660
 ttgcataccg aaggccgtaa agttccgtgt gtgggactgaa gtatcggtgt tgacgtatc 720
 ttttagcatcg tggaaacaacg tctggaaaggcg ctggaggaga aaattcgta caccgaaacc 780
 caagttctgg ttgcctcagc tcagaaaaaa ctgctggaa aacgcctgaa actggtagc 840
 gaactgtggg atgctggcat taaagccgaa ctgctgtata aaaaaaaaaacc gaaactgctg 900
 aatcagctgc agtattgtga ggaagcgggt attcctctgg tggccattat cggagaacag 960
 gaactgaaag acggcgttat taaactgcgt agcgtgaccc tctcgtaa agttgacgtt 1020
 cggccgtgaaag atctggtcga ggaaatcaaa cgtcgtaaccg gtcaacccctt gtgtatattgc 1080
 ctcgag 1086

<210> 104

<211> 1206

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид гистидил-тРНК-синтетазы

<400> 104

ggatccgcag aacgtgccgc cctggaaagag ctggtaaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
 ggtctgaaac agcagaaaagc aagcgctgaa ctgatcgaag aagaagtggc gaaaactgctg 120
 aaactgaaag cacagctggg tcctgatgaa tcaaaaacaaa aattcgtcct gaaaactccg 180
 aaaggaaactc gtgattatag ccctcgccag atggctgtcc gtggaaaagt gttcgatgtg 240
 atcattcgct gcttcaaaccg tcatggtccc gaagtcattt ataccccggt gttcgagctg 300
 aaagtgaacg atcgccgtat tctggatggc atgttcgcca tttgtggtgt tagcgatagc 360
 aaattccgta caatctgctc tagcgtggac aaactggaca aagttagctg ggaagaggtg 420
 aaaaacgaga tggtggtga gaaaggccgt gctcctgaag ttgccgaccg tattcgagat 480
 tatgttcagc agcatggcgg agtttcactg gttgaacaac tgctgcaaga cccgaaaactg 540
 tctcagaaca aacaggcact ggaaggctcg ggagatctga aactgctgtt cgagtatctg 600
 acgctgtcg gtattgacga caaaatttcc ttgcacctgt cgctggcaccg tggtctggat 660
 tattatacag gcgtgatcta tgaggctgta ctgctgcaga caccagcaca agcagggtgaa 720
 gaggccctgg gtgttgggtc agttgctgccc ggtggacgtt atgacggact ggtaggatg 780
 ttgcataccaa aaggccgtaa agtcccggtgt gttaggactgt tattggcgt tgacgtatc 840
 ttttagcatcg tggagcaacg tctggaaagct ctggaggaga aaatccgtac caccgaaacc 900
 caagttctgg ttgcctcagc tcagaaaaaa ctgctggaa aacgcctgaa actggtagc 960
 gaactgtggg atgctggcat taaagccgaa ctgctgtata aaaaaaaaaacc gaaactgctg 1020
 aatcagctgc agtattgtga ggaagcgggt attcctctgg tggccattat cggagaacag 1080
 gaactgaaag acggcgttat taaactgcgt agcgtgaccc tctcgtaa agttgacgtt 1140
 cggccgtgaaag atctggtcga ggaaatcaaa cgtcgtaaccg gtcaacccctt gtgtatattgc 1200
 ctcgag 1206

<210> 105

<211> 1428

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид гистидил-тРНК-синтетазы

<400> 105

ggatccgcag aacgtgccgc cctggaaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
 ggtctgaaac agcagaaaagc aagcgctgaa ctgatcgaag aagaagtggc gaaactgctg 120
 aaactgaaag cacagctggg tcctgatgaa tcaaaacaaa aattcgtcct gaaaactccg 180
 aaaggaactc gtgattatag ccctcgccag atggctgtcc gtgaaaagt gttcgatgtg 240
 atcattcgct gcttcaaaccg tcatggtccc gaagtcattg ataccccggt gttcgagctg 300
 aaagaaaaccg tcatggcata atatgggaa gattccaaac tgatctatga cctgaaagac 360
 cagggaggtg aactgctgtc tctgcgttat gacctgactg ttccctttgc tcgctatctg 420
 gccatgaata aactgaccaa catcaaacgc tatcatatcg ccaaagtgtt tcgcccgtgac 480
 aatccagcaa tgaccctgtgg tcgttatcgtt gaattttatc agtgtgtgaa cgatcgccgt 540
 attctggacg gcatgttcgc catttgtgtt gtgtctgtact ccaaatttcg tacgatctgc 600
 tcaagcgtgg acaaaactgga caaagtggc tggtggagg tgaaaaacga gatgggtgggt 660
 gagaaaggcc tggctctgaa agttggccac cgtatcgagg attatgttca gcagcatggc 720
 ggagtttcac tggtaaca actgctgca gaccggaaac tgcacagaa caaacaggca 780
 ctggagggtc tggggatct gaaaactgctg ttgcgtatc tgacgctgtt cggatttgac 840
 gacaaaatca gcttcgtatc gacccgtggca cgtggctggg actattatac cggcgtgatt 900
 tatgaagccg ttctgctgca gactccagca caagcagggt aagagccctt ggggtttgg 960
 agtgtggcag ccgggtggccg ttatgtatgtt ctgggtggca tggttgaccc gaaaggccgt 1020
 aaagtcccgt gtgttaggact gtctatcgcc gtggagcgta ttttagcat cgtggaaacaa 1080
 cgcctggaag ctctgaaaga gaaaatccgt accacccgaaa cccaaagtctt gttgcctca 1140
 gtcagaaaaa aactgctgga agaacgcctg aaactggta ggcgactgtg ggtgtgtggc 1200
 attaaagccg aactgctgtt taaaaaaaaac ccgaaactgct tgaatcagct gcagtattgt 1260
 gaggaagcgg gtattccctt ggtggccatt atcgagaac aggaactgaa agacggcggtt 1320
 attaaactgc gtagcgtgac ctctcgtgaa gaagggttgc ttccgttgc agatctggc 1380
 gagggaaatca aacgtcgtac cggtaacct ctgtgttattt gcctcgag 1428

<210> 106

<211> 1416

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид гистидил-тРНК-синтетазы

<400> 106

ggatccgcag aacgtgccgc cctggaaagag ctggtaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
 ggtctgaaac agcagaaaagc aagcgctgaa ctgatcgaag aagaagtggc gaaactgctg 120
 aaactgaaag cacagctggg tcctgatgaa tcaaaacaaa aattcgtcct gaaaactccg 180
 aaagaaaaccg tcatggcata atatgggaa gattccaaac tgatctatga cctgaaagac 240
 caaggcggtg aactgctgtc cctgcgttat gacctgactg ttccgttgc tcgttatctg 300
 gccatgaata aactgaccaa cattaaacgc tatcacattt ccaaagtgtt tcgcccgtgac 360
 aatcctgcta tgactcgtgg acgttatcgtt gaattctatc agtgtgtactt cgatattgcc 420
 ggcaacttcg accctatgtat tccggatgtt gaatgcgtt aaatcatgtt tgagatcctg 480
 agcagcctgc aaatttggta cttccgtgtt aaagtgtatc accgtcgat cctggatggc 540
 atgttcgcca tttgtgtgtt tagcgattcc aaatccgtt ccatctgtt tagtgtggac 600
 aaactggata aagttagctg ggaagaggtt aaaaacgaaa tggtggccga aaaaggcttg 660
 gcacctgagg ttgctgtatcg tatcggttgc tatgtccagc agcatggagg tggttactg 720
 gttgagcaac tgctgcaaga tccgaaactg tctcagaaca aacaggccct ggaaggactg 780
 ggtgatctga aactgctgtt cgagtatctg acgctgttgc gtattgtatc caaaatctcg 840
 ttccgacctgt ctctcgttgc tggactggat tattatacgg gcgtaatcta tgaagctgtc 900
 ctgctgcaga caccacaca agcaggttga gaccccttgg tggttggaa tggtgttgc 960
 ggtggcgct atgacggact gttggcatg ttgcgttgc aaggccgtt agtccgtgt 1020
 gttaggactga gcattggcggt tgacgtatc tttccatcg ttgcgttgc tctggaaagca 1080
 ctggaaagaga aaatccgtac caccgaaacc caagttctgg ttgcctcagc tcagaaaaaaa 1140
 ctgctggaaag aacgcctgaa actgggttgc gaactgtggg atgctggcat taaagccaa 1200
 ctgctgtata aaaaaaaaaaccg gaaactgctg aatcagctgc agtattgttga ggaagcggtt 1260
 attcctctgg tggccattat cggagaacag gaactgaaag acggcgat taaactgcgt 1320
 agcgtgaccc ttcgttgc gtttgcgtt ccgcgttgc gaaatcaaa 1380
 cgtcgatccg gtcaacctt ctgttatttgc ctgcgtt 1416

<210> 107
<211> 1314
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид гистидил-тРНК-синтетазы

<400> 107
ggatccgcag aacgtgccgc cctggaaagag ctggtaaaaac tgcaaggcga gcgtgttcgt 60
ggctgaaac agcagaaaagc aagcgctgaa ctgatcgaag aagaagtggc gaaaactgctg 120
aaactgaaag cacagctggg tcctgatgaa tcaaaaacaaa aattcgtcct gaaaactccg 180
aaaggaactc gtgattatacg ccctcgccag atggctgtcc gtgaaaaagt gttcgatgtg 240
atcattcgct gcttcaaacg tcatggtgcc gaagtcattg ataccccggt gttcgagctg 300
aaagatttcg atattgcccgg caactttgtat ccgatgattc cgatgctga gtgtctgaaa 360
atcatgtgtg agatcctgag tagtctgcag attggggatt tcctggtaaa agtgaacgat 420
cgccgtattc tggacggcat gtttgcatt tgtggcgta gcgatagcaa attccgtacg 480
atctgttagca gtgtggacaa actggataaa gtctttggg aagaggtcaa aaacgagatg 540
gttggtgaga aaggcctggc tcctgaagtg gctgaccgta ttggtgatta tgcagcagcag 600
catggtggtt tttcaactggt tgaacaactg ctgcaagacc cgaaactgtc tcagaacaaa 660
cagggcactgg aaggctctggg tgatctgaaa ctgctgtcg agtatctgac gctgttcggt 720
attgacgaca aaatttcctt cgacctgtca ctggcacgtg gtctggatta ttatacaggc 780
gtaatctatg aggctgtact gctgcaaact ccagcacaag caggtgaaga acotctggga 840
gttggtagtg tagcggcagg gggtcgttat gatgggctgg tcgggatgtt cgatccaaaa 900
ggccgtaaag tcccgtgtt tggtctgtt attggcgttg agcgtatctt ctccatcg 960
gagcaacgctc tggaaagctt gaaagaaaaa atccgtacca ccgaaaccca agttctgg 1020
gcctcagctc agaaaaaaact gctggaagaa cgcctgaaac tggtagcga actgtgggat 1080
gctggcatta aagccaaact gctgtataaa aaaaacccga aactgctgaa tcaagctgcag 1140
tattgtgagg aagcgggtat tcctctggg gccattatcg gagaacagga actgaaagac 1200
ggcgttatta aactgcgtag cgtgacctt cgtgaagaag ttgacgttcg ccgtgaagat 1260
ctggtcgagg aaatcaaacg tcgtaccggc caacctctgt gtatttgcct cgag 1314

<210> 108
<211> 432
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> кодон-оптимизированный полинуклеотид гистидил-тРНК-синтетазы

<400> 108
ggatccttcg accaaaagg ccgtaaagtt ccgtgtgttag ggctgtctat cggtgttag 60
cgtatcttc ccatcggtga gcagcgtctg gaagcaactgg agaaaaaaat ccgtacgacc 120
gagactcaag tcctgggtgc tagtgccccag aaaaaactgc tggaagagcg cctgaaaactg 180
gttagtgagg tggatgtgc cggtattaaa gccgaactgc tgtataaaaa aaacccgaaa 240
ctgctgaatc agctgcagta ttgtgaagaa gcggcattc cgctggtagc gattatcg 300
gaacaagaac tgaaagatgg cgtgatcaa ctgcgtagcg ttacaagccg tgaggaagtg 360
gacgtccgccc gtgaggatct gttgaagag attaaacgccc gtacaggtca 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	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr
65				70				75							80
Val	Gln	Gln	His	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp
								85							95
Pro	Lys	Leu	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu
								100							110
Lys	Leu	Leu	Phe	Glu	Tyr	Leu	Thr	Leu	Phe	Gly	Ile	Asp	Asp	Lys	Ile
								115							125
Ser	Phe	Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Gly	
								130							140

<210> 110

<211> 429

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 110

tgcctgaaga tcatgtgcga gatcctgagt tcacttcaga taggcgactt cctggtaaag 60
 gtaaacgatc gacgcattct agatggatg tttgttatct gtgggtttc tgacagcaag 120
 ttccgtacca tctgcttcctc agtagacaag ctggacaagg tgcctggaa agaggtgaag 180
 aatgagatgg tgggagagaa gggccttgca cctgaggtgg ctgaccgcat tggggactat 240
 gtccagcaac atgggtgggt atccctgggt gaacagctgc tccaggatcc taaaactatcc 300
 caaaacaaggc aggcccttggaa gggcctggaa gacctgaagt tgctcttga gtacctgacc 360
 ctatggca ttgatgacaa aatctccctt 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	Leu
								20					25		30
Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu	Val	Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg
								35					40		45
Ile	Leu	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Ile	Cys	Gly	Val	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe
								50					55		60
Arg	Thr	Ile	Cys	Ser	Ser	Val	Asp	Lys	Leu	Asp	Lys	Val	Ser	Trp	Glu
								65					70		80
Glu	Val	Lys	Asn	Glu	Met	Val	Gly	Glu	Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Val
								85					90		95
Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Gln	Gln	His	Gly	Gly	Val	Ser	Leu
								100					105		110
Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Lys	Leu	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Ala
								115					120		125
Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu	Leu	Phe	Glu	Tyr	Leu	Thr	Leu
								130					135		140
Phe	Gly	Ile	Asp	Asp	Lys	Ile	Ser	Phe	Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly
								145					150		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													
				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
gtcaaaagtga	acgatcgccg	tattctggat	ggcatgttgc	ccatctgtgg	tgttagcgac	120
tccaaattcc	gtacaatctg	tagcagcgtg	gacaaaactgg	ataaaagtgtc	ctgggaagag	180
gtgaaaaaacg	aaatggtggg	tgaaaaaggt	ctggctccgg	aggttgcgtga	ccgtatcggt	240
gattatgttc	agcagcacgg	cgggtttagt	ctgggtgaac	aactgctgca	agacccgaaa	300
ctgtctcaga	acaaacaggc	cctggaaagga	ctggagatc	tgaaaactgt	gttcgagtat	360
ctgacgctgt	tcggcattga	tgacaaaatt	tcttcgacc	tgtcactggc	acgtggactg	420
gactattata	ccggctctcga	g				441

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Терапевтическая композиция для лечения воспалительного заболевания, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и изолированный полипептид аминоацил-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 (PK).

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 (PK).

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:

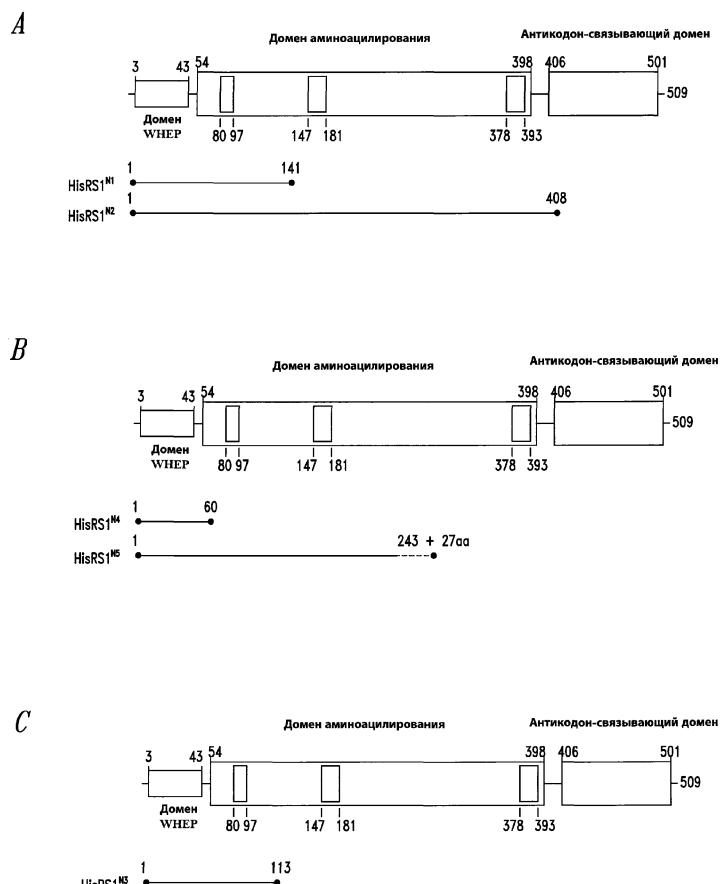
а) объединение полипептида AARS по меньшей мере с одним исследуемым соединением в подходящих условиях связывания и

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

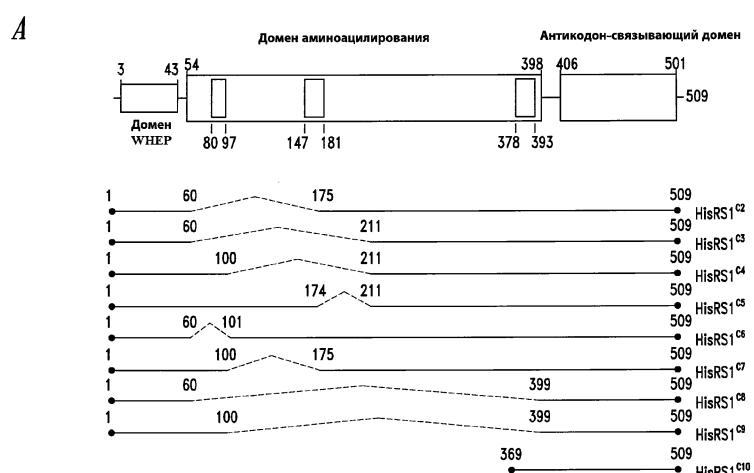
11. Способ лечения воспалительного заболевания путем введения полипептида AARS по любому из пп.4-6.

12. Способ по п.11, где воспалительным заболеванием является системный ювенильный артрит, системная красная волчанка, болезнь Крона и ревматоидный артрит.

030418



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2